

Gladys Daniela Rogge Renner

**ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS
DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e do Desenvolvimento
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em Biologia
Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro
Guerra

Coorientadoras: Profa. Dra. Zenilda L.
Bouzon e Profa. Dra. Neusa Steiner

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rogge-Renner, Gladys Daniela

Origem e desenvolvimento de embriões zigóticos de
Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze. / Gladys Daniela
Rogge-Renner ; orientador, Miguel Pedro Guerra ;
coorientadora, Zenilda Laurita Bouzon e Neusa Steiner. -
Florianópolis, SC, 2014.

92 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. biologia
do desenvolvimento vegetal. I. Guerra, Miguel Pedro. II.
Neusa Steiner, Zenilda Laurita Bouzon e. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

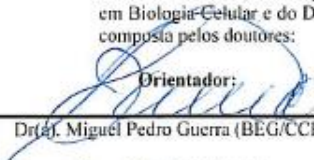
"Origem e desenvolvimento de embriões zigóticos de *Araucaria angustifolia*
(Bertol.) Kuntze"

por

Gladys Daniela Rogge Renner

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos
membros titulares da Banca Examinadora (Port.
04/PPGBCD/2014) do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e do Desenvolvimento – UFSC,
composta pelos doutores:

Orientador:


Dr(a). Miguel Pedro Guerra (BEG/CCB/UFSC)

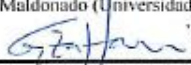
Coorientadoras:

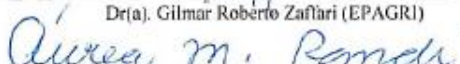

Dr(a). Neusa Steiner (BOT/CCB/UFSC)



Dr(a). Zenilda Laurita Bouzon (BEG/CCB/UFSC)

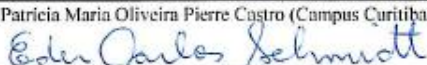
Banca examinadora:


Dr(a). Sara Beatriz Maldonado (Universidad de Buenos Aires)

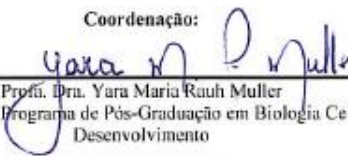

Dr(a). Gilmar Roberto Zaffari (EPAGRI)


Dr(a). Áurea Maria Randi (BOT/CCB/UFSC)


Dr(a). Patricia Maria Oliveira Pierre Castro (Campus Curitibanos/UFSC)


Dr(a). Éder Carlos Schmidt (PPGBCD/CCB/UFSC)

Coordenação:


Prof(a). Yara Maria Rauh Muller
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Florianópolis, 21 de março de 2014.

Dedico este trabalho com muito amor à
vida e ao meu filho, Vitor Rogge Renner.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Vitor e ao meu marido João Vicente, por todo amor, apoio e incentivo que me deram e de quem tanto tempo de convívio roubei, pela paciência e compreensão ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais Carlos e Teresinha, minha irmã Thais, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Miguel P. Guerra por todos os ensinamentos, contribuições, exemplos, oportunidades, especialmente pelos momentos de compreensão e principalmente por ter acreditado no meu trabalho.

A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Zenilda L. Bouzon pela grande contribuição, conhecimento, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho, especialmente por seu exemplo como profissional, mulher, mãe e avó.

A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Neusa Steiner, pelo grande exemplo de vida, de ética e profissionalismo. Agradeço imensamente sua disposição em me ajudar e por suas valiosas contribuições no mais amplo sentido destas palavras, pelo estímulo, amizade e por sua dedicação durante toda a realização deste trabalho.

Ao Dr. Éder Carlos Schmidt, por sua preciosa e fundamental ajuda, seu profundo conhecimento, senso de humor, paciência e pela amizade.

A Dr.^a Francine Lunardi Farias Soares, por suas contribuições, ajuda, apoio, conversas, cafés e pela amizade.

A Maria Luiza Tomazi Pereira, mestrande, por sua contribuição em diferentes etapas deste trabalho, em especial pela elaboração dos extratos e análises de carboidratos na UENF-RJ.

Aos Profs. Dr. Vanildo Silveira e Dr.^a Claudete Santa Catarina da UENF-RJ, pela parceria realizada e viabilização das análises de carboidratos dos embriões zigóticos.

Aos alunos(as) de iniciação científica Bruna Scheid (UFSC- Florianópolis), Jaqueline Ortiz, Bruna Dorow, Leandro Dill e Leandro Fuck Camargo (UFSC- Curitiba), que muito contribuíram e foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao Felipe Steiner, pela importante contribuição com a elaboração do mapa da área estudada.

Aos amigos do LABCEV (Ticiane, Carmen, Rodrigo, Sérgio, Débora, Marthiellen, Luz K., Marianne, Jenny, Fernanda, Carol, Claudiane, Gabriel) e à Profa. Dr.^a Luciane C. Ouriques, que

compartilharam comigo desta jornada, pelo companheirismo, ensinamentos, discussões enriquecedoras, ajuda, dedicação, especialmente pelos momentos de diversão e descontração.

Aos alunos do LFDGV, que me receberam gentilmente sempre que precisei daquela estrutura, em especial à funcionária da UFSC, Bióloga Camila P. Martins, responsável pelo laboratório durante o período em que lá estive.

Aos professores da banca, que gentilmente aceitaram contribuir na avaliação deste trabalho.

Aos demais professores e coordenadores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PBCD), por todo apoio e ensinamentos compartilhados.

Ao laboratório central de microscopia eletrônica desta universidade (LCME), em especial às funcionárias Eliana, Deise e Renata pela ajuda.

Aos laboratórios multiusuários de estudos em biologia II desta universidade (LAMEB II) e seus funcionários, pelas orientações e ajuda nas análises de microscopia de luz e fluorescência, em especial à Bióloga Chirle Ferreira.

A Universidade da Região de Joinville - Univille, pelo estímulo em capacitar seus professores.

Ao chefe e sub-chefe do Departamento de Ciências Biológicas da Univille, Prof. Dr. Luciano Lorenzi, e Prof. MSc. João Carlos Ferreira de Mello Júnior, respectivamente, por flexibilizarem os meus horários de trabalho para as várias viagens que fiz a Florianópolis no ano de 2013.

A FAPESC e ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os demais colegas, amigos e familiares, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e a realização deste trabalho, recebam esta singela homenagem e a minha eterna gratidão.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>A. angustifolia</i> apresentado por Guerra et al. (2008; 2012).....	23
Figura 2 - Localização da propriedade rural utilizada para as coletas de material biológico de <i>Araucaria angustifolia</i> , no Km 256 da Rod. BR 470, em Curitiba-SC. O mapa identifica a área e marca a posição geográfica das árvores, que foram classificadas em: Matriz Fêmea (plantas de onde foram retiradas pinhas em pelo menos uma coleta); Fêmeas (plantas não utilizadas nas coletas); Machos (plantas utilizadas eventualmente e aleatoriamente nas coletas de microestróbilos) e Jovens (plantas em que não havia estrutura reprodutiva visível). (Elaboração do mapa: Felipe Steiner).....	32
Figura 3 - Representação do ciclo de vida de <i>A. angustifolia</i> apresentado por Guerra et al. (2008; 2012) com adaptações.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenvolvimento reprodutivo de <i>A. angustifolia</i> entre 2010 e 2012, crescendo em Curitibaanos – SC, desde a polinização até a maturação da semente.....	79
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT-O- Azul de Toluidina
BEG- Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética
CBB- Comassie Brilliant Blue (Azul Brilhante de Coomassie)
CC- célula da capa
CCA- Centro de Ciências Agrárias
CCB- Centro de Ciências Biológicas
CE- célula embrionárias
CS- célula de suspensor
CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAPI- 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole
FAPESC- Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina
FLUORBEG- Laboratório de Microscopia de Fluorescência
IC- instrução normativa
LAMEB - Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia
LABCEV- Laboratório de Biologia Celular Vegetal
LCME- Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LFDGV- Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
M- molaridade
MCVL- microscopia confocal de varredura a laser
ME- megaestróbio
MET- microscopia eletrônica de transmissão
MEV- microscopia eletrônica de varredura
MF- microscopia de fluorescência
MG- Minas Gerais
ML- microscopia de luz
PAS- ácido periódico de Schiff
PBCD- programa de pós graduação em biologia celular e do desenvolvimento
SC- Santa Catarina
TX- Texas
UENF- Universidade Estadual Norte Fluminense
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina
UICN- União Internacional para a Conservação da Natureza
UNIVILLE- Universidade da Região de Joinville
UV- ultravioleta
P/V- peso/volume

RESUMO

Araucaria angustifolia é conhecida como pinheiro brasileiro. Faz parte da floresta ombrófila mista, e ocupou originalmente uma área coberta de 20 milhões de hectares no Brasil e atualmente restam apenas 2% da área inicial. Em função da exploração comercial, foi classificada como criticamente ameaçada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) e aparece na Lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção. Para se estabelecer programas de recuperação das áreas degradadas, entre outras ações, seria necessário produzir mudas a partir de sementes de *A. angustifolia*. Mas as sementes perdem a viabilidade ao serem desidratadas, não sobrevivendo à conservação por longos períodos. Para se tentar resolver o problema da perda da viabilidade das sementes é necessário estabelecer tecnologias para a conservação da espécie, que utilizam conhecimentos básicos sobre o ciclo reprodutivo e a o desenvolvimento o embrião zigótico. No entanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento do embrião zigótico de araucária e sobre etapas que ocorrem entre a polinização e a formação da semente madura. Neste trabalho foram utilizadas análises morfológicas, ultraestruturais e histoquímicas para se conhecer a organização morfológica do desenvolvimento embrionário em *A. angustifolia*. O material vegetal para as análises foi obtido dos megaestróbilos coletados periodicamente a partir de plantas femininas selecionadas e dos microestróbilos, coletados aleatoriamente em uma propriedade rural na região de Curitiba-SC. Os megaestróbilos foram mensalmente fotografados e das escamas férteis foram obtidos nucelos, megagametófitos, proembriões e embriões dominantes para retirada dos meristemas. Os grãos de pólen foram obtidos de microestróbilos. Os materiais vegetais foram processados para as técnicas de microscopias de luz, confocal e fluorescência, análises histoquímicas, além das microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão. Observou-se que a polinização ocorreu em agosto e setembro e os grãos de pólen de *A. angustifolia* apresentaram superfície granulosa, parede espessa, com compostos de reserva como grãos de amido, vacúolos e núcleos. Nas escamas férteis coletadas a partir de janeiro do primeiro ano do ciclo reprodutivo, pode ser observada a formação de núcleos livres na região central dos nucelos em desenvolvimento, permanecendo esta formação até julho do primeiro ano do ciclo reprodutivo. Entre julho e setembro do mesmo ano, os núcleos livres dão lugar a células em arranjo elipsóide, evoluindo para a formação de um tecido protalial. A partir de setembro foram identificadas as primeiras arquegônias no tecido

protalial, já no segundo ano do ciclo reprodutivo. Em novembro os proembriões estavam formados, concluindo-se que a fertilização ocorreu em outubro. Como ocorre em outras coníferas, nos proembriões de *A. angustifolia* são identificados três tipos celulares: células da capa, embrionárias e do suspensor. Observou-se que as células da capa apresentaram núcleos compactados e muitos vacúolos no citoplasma. As células embrionárias apresentam formato poliédrico, núcleo grande, ativo e central, enquanto as células do suspensor apresentam formato alongado, raramente eram nucleadas e apresentaram grandes vacúolos. O embrião dominante foi identificado em fevereiro de 2012, no segundo ano do ciclo reprodutivo. Nos meristemas do embrião dominante de *A. Angustifolia* na fase cotiledonar, foi observado que as células exibem características pluripotentes, como mecanismos de comunicação intercelular e de diferenciação - parede celular fina e irregular com plasmodesmos. No interior das células, mitocôndrias, vacúolos, muitos corpos lipídicos, corpos de Golgi, muitos amiloplastos, retículo endoplasmático e grandes núcleos foram observados. Os resultados ampliam o conhecimento sobre o desenvolvimento reprodutivo de *A. angustifolia*, fornecendo informações científicas iniciais para o aprofundamento em estudos evolutivos, biotecnológicos, de melhoramento genético e programas de conservação da espécie.

Palavras-chave: embriogênese zigótica, microscopia, histoquímica, células meristemáticas

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is known as Brazilian pine. Part of the *Araucaria* forest, and originally occupied a covered area of 20 million hectares in Brazil and currently there are only 2 % of the initial area. Depending on the commercial exploitation has been classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) and appears in the official list of Brazilian endangered species. To establish the recovery of degraded areas, among other actions, would be necessary to produce seedlings from seeds of *A. angustifolia*. But the seeds lose viability when they are dehydrated, not surviving the conservation for long periods. To solve the problem of the loss of seed viability is necessary to establish technologies for the conservation of the species, using basic knowledge about the reproductive cycle and the zygotic embryo development. However, little is known about the development of zygotic embryos of *Araucaria* and on steps that occur between pollination and formation of the mature seed. In this work morphological, ultrastructural and immunohistochemical analyzes to know the morphological organization of embryonic development in *A. angustifolia* were used. The plant material for analysis was obtained from megastrobili collected periodically from selected female plants and microstrobili randomly collected from a farm in the region of Curitiba - SC. The monthly megastrobili collected were photographed and from fertile scales nucellus, megagametophytes, proembryos and dominant embryos for withdrawal of meristems were obtained. The pollen grains were obtained from microstrobili. The plant materials were processed for light microscopy techniques, confocal and fluorescence histochemical analyzes, besides the electronic scanning microscopy and transmission. It was observed that pollination occurred from August to September and the pollen grains of *A. angustifolia* showed granular surface, thick-walled, with reserve compounds such as starch grains, vacuoles and nuclei. In the fertile scales collected from January of the first year of the reproductive cycle, the formation of free nuclei in the central region of the nucellus in development can be observed, remaining this training until July of the first year of the reproductive cycle. Between July and September of the same reproductive year, free nuclei give rise to cells ellipsoid arrangement, progressing to the formation of a protalial tissue. From September to October, the first arquegonia were identified, in the second year of the reproductive cycle in protalial tissue. In November the proembryos were already formed, concluding that fertilization occurred in October. Cap,

embryonic and suspensor cells: in coniferous proembryos these three cell types are identified. It was observed that the cells of the compressed nuclei and cover have vacuoles in the cytoplasm. Embryonic cells have polyhedral shape, large, active and central nucleus, while cells of the hanger feature elongated, nucleated and were rarely showed large vacuoles. The dominant embryo was identified in February 2012, the second year of the reproductive cycle. Meristems of dominant *A. angustifolia* embryo on cotyledon stage was observed that cells exhibit pluripotent characteristics, such as intercellular communication mechanisms and differentiation - irregular and thin cell wall with plasmodesmata. Inside the cells, mitochondria, vacuoles, many lipid bodies, Golgi bodies, many amyloplasts, endoplasmic reticulum and large nuclei were observed. The results extend the knowledge on the reproductive development of *A. angustifolia*, providing early scientific information to deepen in, biotechnology, evolutionary studies of breeding programs and conservation of the species.

Keywords: zygotic embryogenesis, microscopy, histochemistry, meristematic cells

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
1.1 TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO DA <i>ARAUCARIA</i> <i>ANGUSTIFOLIA</i>	21
1.2 CICLO REPRODUTIVO.....	22
1.2.1 Microsporogênese.....	23
1.2.2 Megasporogênese.....	24
1.2.3 Embriogênese zigótica.....	25
1.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E ECOLÓGICA.....	29
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	31
3.2. ANÁLISE MORFOHISTOLÓGICA.....	33
3.2.1. Microscopia de luz (ML).....	33
3.2.2. Estereomicroscópio.....	34
3.2.3. Análises histoquímicas.....	34
3.2.4. Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).....	35
3.2.5. Microscopia de fluorescência (MF).....	36
3.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	36
3.3. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	37
3.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	37
CAPITULO 1.....	38
THE REPRODUCTIVE BIOLOGY OF BRAZILIAN PINE (<i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i>): POLLINATION, PRE- FERTILIZATION DEVELOPMENT AND PROEMBRYOGENY.....	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
CAPÍTULO 2.....	67
STRUCTURAL AND COMPONENTS CHARACTERIZATION OF MERISTEM CELLS IN <i>ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA</i> (BERT.) O. KUNTZE ZYGOTIC EMBRYO.....	67

RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	69
4 CONCLUSÃO.....	79
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO DA ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA

A *Araucaria angustifolia* (Bertolini) Otto Kuntze, pertence à família Araucariaceae e apresenta uma ampla distribuição no hemisfério sul, ocorrendo na Nova Caledônia, Nova Guiné, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul (Setoguchi et al. 1998). As principais espécies da família Araucariaceae presentes na América do Sul são *A. araucana* (Molina) K. Koch, conhecida como araucária-do-chile e *A. angustifolia* (Bertol.) Kuntze, conhecida no Brasil pelos nomes de pinheiro-do-paraná, pinheiro brasileiro ou simplesmente araucária e a única naturalmente presente em nosso país (Shimizu e Oliveira, 1981).

O pinheiro-do-paraná marca a fisionomia do planalto do sul do Brasil e, por sua imponência e fonte de recursos como a madeira e o pinhão, é considerado o tesouro dessa região (Sevegnani et al. 2013).

O termo *Araucaria* deriva de Arauco, região do Chile de onde o gênero procede e *angustifolia*, do latim *angustus*, estreito, pontudo e *folium*, folha. *A. angustifolia* é uma conífera dióica, raramente monóica após trauma ou doença, com estruturas unissexuais (Reitz e Klein, 1966).

As grandes regiões de matas virgens ou primitivas cobertas de *A. angustifolia* foram chamadas de matas pretas por Reitz e Klein (1966) em função da predominância desta espécie que apresenta ramos e folhas de cor verde escura. Os nomes pinhal, pinheiral, mata de araucária, floresta com araucária, já foram alguns dos utilizados para designar o tipo de formação vegetal com a predominância da *A. angustifolia* ao longo do tempo, mas atualmente Floresta Ombrófila Mista é o mais utilizado (Cordeiro, 2005).

A Floresta Ombrófila Mista integra o bioma da Mata Atlântica. O termo Ombrófila se refere à alta pluviosidade com chuvas bem distribuídas na região da formação florestal (IBGE 1992; 2012). A denominação Mista refere-se à presença das gimnospermas *A. angustifolia* e *Podocarpus lambertii* (Klotzsh ex Eichler) com angiospermas primitivas como *Drymis* (J.R. Forts. E G. Forst.) (Winteraceae), *Ocotea* (Aubl.), *Cryptocarya* (R. Br.) e *Nectandra* (Rol. ex Rottb.) (Lauraceae), entre outras (Veloso et al. 1991; IBGE 1992; 2012).

Nos estados do sul do Brasil, em torno de 35% da cobertura vegetal no início do século XX eram representados pela Floresta

Ombrófila Mista, enquanto o Estado de Santa Catarina apresentava uma área coberta próxima a 42,5% (Guerra et al. 1999; 2002; 2008)

Originalmente, a Floresta Ombrófila Mista com *A. angustifolia* representava uma área coberta de 20 milhões de hectares no Brasil. Atualmente, representa menos de 2% da área original (Guerra et al. 2002).

1.2. CICLO REPRODUTIVO

Plantas com sementes como as Gimnospermas apresentam um ciclo de vida diplohaplôntico que se alterna entre uma fase dominante, que é a fase esporófitica, e outra fase mais curta, a gametófitica. Coníferas são espécies de vida longa, que podem produzir gametófitos masculino e feminino anualmente por centenas ou mesmo milhares de anos (Williams, 2009).

A biologia reprodutiva de uma espécie envolve mais do que apenas conhecer o ciclo reprodutivo. Cada espécie tem um potencial reprodutivo determinado pelo número de megaestróbilos por árvore e sementes por megaestróbilos que podem ser produzidos em uma determinada idade e do tamanho da árvore. A árvore tem também um sucesso reprodutivo, determinado pela proporção de megaestróbilos e sementes que sobrevivem até a maturidade (Owens et al. 1995; Owens 2004; 2006).

Para a espécie *A. angustifolia*, o ciclo reprodutivo compreende a emergência da planta, acompanhada de uma etapa de desenvolvimento lento (4 ou 5 anos), que é seguida pelo crescimento da planta até se tornar o esporófito adulto com surgimento das estruturas reprodutivas (megaestróbilos ou microestróbilos) polinização, formação das arqueônias, fertilização, desenvolvimento e maturação dos megaestróbilos e das sementes (Guerra et al. 2008; Mattos 2011; Guerra et al. 2012).

O ciclo reprodutivo da *A. angustifolia* foi apresentado por Guerra et al. (2008; 2012) e reproduzido a seguir (Figura 1). Ao se observar a Figura 1, a presença do esporófito adulto será considerada o início do ciclo reprodutivo para a explicação no texto. No ciclo foram representados o megaestróbilo e o microestróbilo, compostos por megaesporângios e microesporângios, respectivamente. Guerra et al. (2008; 2012), relataram que a liberação dos grãos de pólen dos microestróbilos pelos microesporângios ocorre entre agosto e setembro do ano I do ciclo reprodutivo. Os grãos de pólen são transportados pelo vento e depositados nas escamas ovulíferas dos megaesporângios, sem

se saber o momento da fecundação. No ciclo reprodutivo foi relatada a presença de uma fase de núcleos livres após a fertilização. Após a formação dos núcleos livres ocorreu a elongação celular e formação de poliembriões (explicada mais adiante, no item 1.2.3.), que apresentam células da capa, embrionárias e do suspensor (Guerra et al. 2008; 2012). Apenas um embrião dominante permanece na semente e se desenvolve até a forma madura, enquanto os embriões subordinados regredem (Figura 1) (Burlingame, 1915; Johansen, 1950; Guerra et al. 2008; 2012).

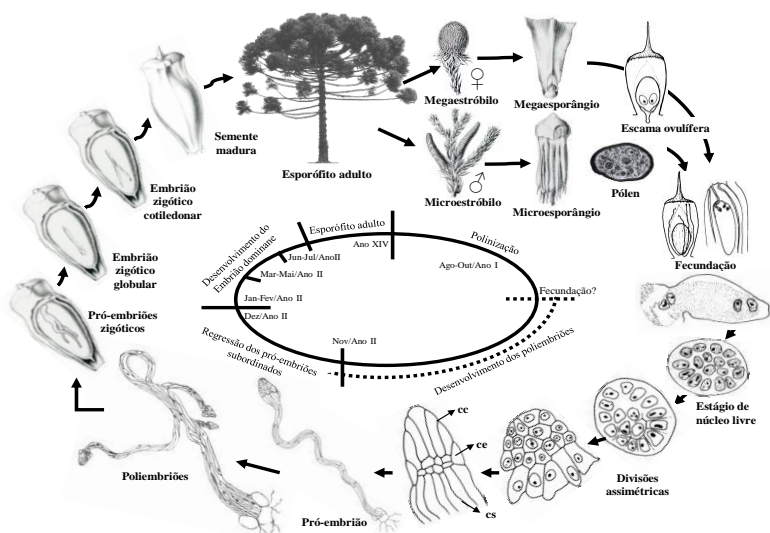


Figura 1. Ciclo de vida de *A. angustifolia* apresentado por Guerra et al. (2008; 2012).

1.2.1. Microsporogênese

A *A. angustifolia* é uma espécie dióica e o esporófito adulto (planta masculina) produz o microestróbilo ou estróbilo masculino, que é a estrutura reprodutiva. O microestróbilo é constituído por escamas ou microsporófilos presos a um eixo central (Reitz e Klein, 1966; Mattos, 2011). Os microsporófilos apresentam os sacos polínicos ou microspórangios, onde ocorre a microsporogênese. A microsporogênese

se inicia a partir da meiose de um microsporócito (ou célula mãe do pólen) produzindo quatro micrósporos haploides (Williams, 2009).

A meiose ocorre nos sacos polínicos no lado de baixo (abaxial) de cada microsporófilo (Ferguson, 1904; Korol et al. 1994) e produz uma tétrade de quatro micrósporos. A tétrade rompe e cada um dos seus quatro micrósporos desenvolve uma parede celular. O grão de pólen é composto pelo micrósporo envolvido pela parede celular (Williams, 2009).

Todas as coníferas dependem do vento para mover o pólen até a oosfera (Williams, 2009). Alguns estudos no Brasil descrevem o início da polinização em *Araucaria angustifolia*, tais como Shimoya (1962), Mantovani et al. (2004) e Anselmini e Zaneti, (2008). De acordo com Shimoya (1962), o início da polinização em Viçosa, MG, ocorre no final de setembro, enquanto Mantovani et al. (2004) observaram no Estado de São Paulo a liberação de pólen em agosto e setembro. No sul do Brasil, este fenômeno ocorre entre os meses de agosto a outubro (Anselmini e Zaneti, 2008).

O pólen é depositado em qualquer lugar da escama do cone feminino e inicia a germinação *in situ* (Guerra et al. 2008; 2012). De acordo com Shimoya (1962), a germinação dos grãos de pólen em *A. angustifolia* ocorre primeiramente na parte externa, sem penetrar na nucela, formando uma delicada teia entre outubro e dezembro. A hidrólise de grãos de amido nas células da região nucelar precede o crescimento do tubo polínico em *Agathis australis* (D. Don) Loudon, outra espécie da família Araucariaceae. Os tubos polínicos penetram a ponta nucelar e ali permanecem sem penetrar mais profundamente durante o período nuclear livre (Owens et al. 1995). Em *A. angustifolia*, as células do parênquima nucelar apical, ricas em amido, fornecem energia e são fundamentais para o crescimento do tubo polínico (Shimoya, 1962).

1.2.2. Megasporogênese

A planta feminina (esporófito adulto feminino) de *A. angustifolia* produz a estrutura reprodutiva chamada megaestróbilos ou estróbilos feminino, conhecido popularmente como pinha. Os megaestróbilos são compostos de megasporófilos ou escamas ovulíferas e brácteas, presas a um eixo central. Nos megasporófilos desenvolvem-se os óvulos, também chamados de megasporângios. A megasporogênese é a meiose da célula mãe do megásporo (megasporócito) dentro do óvulo, dando origem a quatro megásporos. Apenas o megásporo mais próximo da

extremidade chalazal sobrevive, sofre mitose e torna-se multicelular, formando o megagametófito (Burlingame, 1915; Johansen, 1950; Shimoya, 1962; Owens et al. 1995; Williams, 2009; Mattos, 2011).

A fase inicial do megagametófito, dentro do nucelo é marcada pelo surgimento dos núcleos livres, seguidos por uma organização celular com arranjo elipsoide e posterior formação da parede celular para cada núcleo livre inicialmente formado (Shimoya, 1962; Owens et al. 1995).

Simultaneamente ao início da formação do megagametófito, ocorre o começo da penetração dos tubos polínicos. Os tubos polínicos crescem no nucelo e causam destruição celular e o traumatismo, que estimulam a produção de alguma substância, provavelmente hormonal, determinante da divisão celular, que resultará na formação de células protaliais ou protalo a partir dos núcleos livres (Shimoya, 1962; Owens et al. 1995) e mais tarde neste tecido protalial ocorre a formação de arquegônias, geralmente numerosas (Shimoya, 1962), cada qual com sua célula ovo. A arquegônia é uma cobertura multicelular em torno de cada célula ovo, no megagametófito (Williams, 2009). A associação entre a formação das arquegônias e a presença dos tubos polínicos no nucelo também foi observada por Ferguson (1904) em espécies dos gêneros *Larix* (Mill.) e *Pinus* (L.).

Em coníferas o megagametófito haplóide não é sinônimo de endosperma, pois não há ocorrência de múltiplas fertilizações. Gimnospermas e Angiospermas têm um megagametófito haplóide, mas apenas as angiospermas formam um endosperma triplóide que resulta de várias fertilizações (Singh, 1978; Williams, 2009).

Em *A. angustifolia*, não foi ainda determinado com exatidão o momento da fertilização (Mantovani et al. 2004; Steiner, 2005 a e b; Guerra et al. 2008; 2012). De acordo com Shimoya (1962), em Viçosa (MG) a fertilização ocorre entre os meses de outubro e dezembro.

1.2.3. Embriogênese zigótica

O processo de singamia ou união de gametas, no qual uma célula masculina entra em contato com a célula ovo feminina, na arquegônia, foi descrito apenas parcialmente para *A. angustifolia* (Johansen, 1950; Williams, 2009).

No começo da vida da planta, o zigoto precisa gerar um novo indivíduo (Weijers e Jürgens, 2005). A embriogênese é o processo biológico que promove a transformação do zigoto em um organismo

pluricelular, utilizando para isso o potencial genético do zigoto e divisões celulares (Souter e Lindsey, 2000).

A formação dos núcleos livres no início do desenvolvimento embrionário é uma característica das Gimnospermas e não ocorre em outros embriões vegetais (Steeves e Sussex, 1989). Em *Araucariaceae*, o zigoto sofre divisões nucleares dentro da arquegônia, originando núcleos livres que variam em número de 32 a 64 antes do início da formação das paredes celulares, durante a fase inicial da embriogênese e o desenvolvimento do proembrião. A elongação começa simultaneamente em ambos os grupos de células superiores e inferiores, imediatamente após a completa formação da parede celular (Burlingame, 1915; Johansen, 1950; Haines e Prakash, 1980; Guerra et al. 2008; 2012).

Estudos morfológicos do desenvolvimento proembrionário em *Araucaria* sp. sugerem que este gênero é um dos mais primitivos, apresentando: (i) a fase de núcleo livre prolongada, (ii) a presença das células da capa e (iii) a ausência de clivagem do proembrião nas espécies de *Araucaria*, se comparado com outras coníferas consideradas evolutivamente superiores, tais como *Cupressaceae*, *Pinaceae* e *Taxodiaceae* (Haines e Prakash, 1980).

A embriogênese zigótica em coníferas é caracterizada pela presença de poliembriões ou poliembrionia, comum nas coníferas, que é a presença de mais de um embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente (Steeves e Sussex, 1989; Williams, 2009). Existem dois tipos básicos de poliembrionia: (a) poliembrionia polizigótica e (b) poliembrionia por clivagem. Na (a) poliembrionia polizigótica, duas ou mais arquegônias são fecundadas em um mesmo megagametófito, produzindo separadamente proembriões, ou seja, cada arquegônia produz um único proembrião. Enquanto o pequeno embrião em desenvolvimento cresce dentro de sua arquegônia é chamado de proembrião (Gifford e Foster, 1989; Williams, 2009) até o crescimento e elongação do suspensor forcarem sua saída desta arquegônia (Owens, 2006). Ainda dentro da arquegônia, cada proembrião formado pode sofrer (b) poliembrionia por clivagem, dividindo-se em até oito proembriões (Steeves e Sussex, 1989). Em espécies do gênero *Araucaria* foi observada apenas poliembrionia polizigótica (Gifford e Foster, 1989). Estudo recente que analisou parâmetros morfológicos com marcadores moleculares relatou a primeira evidência de poliembrionia por clivagem em *A. angustifolia* (Agapito-Tenfen et al. 2012).

Em coníferas simultaneamente ao desenvolvimento embrionário, as células ao redor do embrião, no megagametófito, perdem seu

citoplasma, tornam-se translúcidas e colapsam, formando a cavidade de corrosão em torno do embrião e de seu suspensor. A morte programada das células do megagametófito adjacentes à cavidade fornecem substâncias de reserva que são absorvidas pelo embrião em desenvolvimento. A arquegônia também colapsa, criando uma pequena cavidade no megagametófito na região micropilar da semente (Owens, 2004; Cairney e Pullman, 2007).

A identificação dos poliembriões totalmente formados torna-se possível somente 14 meses após a polinização, pouco tempo antes do início da regressão dos embriões subordinados (Mantovani et al. 2004; Steiner, 2005a; Anselmini e Zaneti, 2008; Guerra et al. 2008; 2012). Em *Pinus* sp. foi observado um período de quase 13 meses entre a polinização e a fertilização (Ferguson, 1904).

Durante a embriogênese zigótica, o plano básico do desenvolvimento nas coníferas é conservado e ocorre através da formação do zigoto, proembriogenia, embriogenia inicial e embriogenia tardia. A proembriogenia inclui todas as etapas do desenvolvimento embrionário que ocorrem antes do alongamento do suspensor. Após o suspensor sofrer alongamento e antes do estabelecimento do meristema radicular, ocorre a fase chamada embriogenia inicial. A embriogenia tardia é a fase caracterizada pela histogênese intensiva, na qual protoderme e procâmbio são diferenciados, e ocorre o estabelecimento dos meristemas apical caulinar e radicular (Singh, 1978; Doderman et al. 1997; von Arnold et al. 2002; Owens, 2004; Williams, 2009).

A sequência do desenvolvimento embrionário em gimnospermas, proposta por Singh (1978), foi modificada por Owens et. al (1982; 1993), que acrescentaram a fase de embriogenia intermediária, caracterizada pelo rápido alargamento do embrião e formação da radícula, parte aérea e cotilédones, entre a embriogenia inicial e a tardia, citadas anteriormente.

Outras classificações também são encontradas, como a de Haines e Prakash (1980) que sugerem a divisão da embriogênese em duas fases: (1) fase proembrionária que vai desde a fertilização até o rompimento da arquegônia pelo proembrião e (2) fase embrionária: a partir do rompimento da arquegônia até a maturação do embrião. Cairney e Pullman (2007) sugerem uma classificação em que a embriogênese é dividida em (1) fase morfogenética, na qual o plano do corpo é estabelecido e (2) fase de maturação, na qual modificações metabólicas prepararam o embrião para a dessecação e dormência. No presente trabalho, optamos por utilizar a classificação do desenvolvimento embrionário proposta por Singh (1978).

Na embriogenia inicial em *A. angustifolia*, os embriões apresentam três tipos celulares definidos: células da capa (cc) na região superior, células embrionárias (ce) na região central e células do suspensor (cs) na região basal do embrião. As células embrionárias iniciais dividem-se longitudinalmente para aumentar em cerca de 20 vezes o número de células. Na região central do embrião, as células embrionárias (ce) permanecem inativas até o completo desenvolvimento do suspensor (Burlingame, 1915; Johansen, 1950; Guerra et al. 2008; 2012).

A embriogenia tardia em coníferas é iniciada com a formação meristemática e histogênese intensiva, que resultam na diferenciação da protoderme e procâmbio, e no estabelecimento dos meristemas apical caulinar e radicular. A região proximal do embrião forma a coifa e o meristema radicular, que é responsável por todo o desenvolvimento posterior da raiz. A região distal forma o eixo hipocótilo-caulinar (futuro tronco) e cotilédones (Singh, 1978; Owens, 2004).

Apenas um embrião permanece na semente madura. A morte celular programada de tipos celulares altamente específicos é parte do desenvolvimento normal e é essencial para o desenvolvimento do embrião (Palavan-Unsal et al. 2005). A morte de tipos celulares específicos também foi observada durante a embriogênese *in vitro* de *Picea abies* (L.) Karst. (Smertenko et al. 2003; Bozhkov et al. 2004) e embriogênese zigótica de *Pinus sylvestris* L. (Filonova et al. 2002).

Em *A. angustifolia* foi demonstrado que a sobrevivência de múltiplos embriões na semente é um evento raro (Steiner, 2005a; Agapito-Tenfen et al. 2012). Se sobreviver e tornar-se o embrião dominante, vai desenvolver o meristema apical caulinar e radicular e atingir a maturidade antes da dispersão de sementes (Owens, 2004; Williams, 2009).

Durante os processos da embriogênese, uma ordem de eventos assegura a posição correta dos tecidos embrionários – os meristemas, cotilédones e hipocótilos – e o arranjo de células dentro de cada tecido. O resultado é a plântula, o ponto de partida fundamental para o resto da vida da planta (von Arnold et al. 2002; Weijers e Jürgens, 2005).

No sul do Brasil o desenvolvimento do embrião dominante ocorre de dezembro a junho, quando os estágios proembrionário, globular, precotiledonar e cotiledonar maduro ocorrem (Steiner, 2005a). Entretanto, sementes maduras podem ser encontradas no início de março. A diferença entre os estágios de maturação dos megasporófitos pode ser explicada pelo fato de que *A. angustifolia* é uma espécie nativa não domesticada e com a possibilidade de duas ou mais variedades

botânicas coexistirem na mesma região (Reitz e Klein, 1966). São descritas para *Araucaria angustifolia* as variedades: *elegans*, *sancti josephi*, *angustifolia*, *caiova*, *indehiscens*, *nigra*, *striata*, *semi-alba* e *alba* (Carvalho, 1994). A colheita de sementes de *A. angustifolia* em Santa Catarina só é permitida após 01 de abril (Santa Catarina, 2011) visando favorecer a dispersão de sementes e consequente conservação da espécie (Guerra et al. 2008; 2012).

A formação de mudas a partir de sementes se restringe a poucos meses do ano, devido à perda da sua capacidade germinativa (Carvalho, 1994), uma vez que as sementes de *A. angustifolia* são recalcitrantes, ou seja, perdem a viabilidade ao serem desidratadas, dificultando a sua conservação por longos períodos (Tompsett 1984; Eira et al. 1991; Espindola et al. 1994; Farias-Soares et al. 2013; Shibata et al. 2013). Em coníferas, a dispersão ocorre pelo vento, mas os seres humanos, aves e outros vertebrados desempenham um importante papel também (Williams, 2009). Em *A. angustifolia*, a dispersão natural das sementes ocorre pela queda ao chão, quando maduras, ou pela dispersão por animais (Mattos 1972; 1994; 2011). Após a germinação esta espécie leva aproximadamente 15 anos para reproduzir (Carvalho, 2003).

Alguns estudos investigaram aspectos bioquímicos e fisiológicos do desenvolvimento do embrião zigótico (Panza et al. 2002, Astarita et al. 2003, Balbuena et al. 2009, Balbuena et al. 2011, Farias-Soares et al. 2013, Shibata et al. 2013). Contudo, há poucos estudos envolvendo mudanças celulares, ultraestruturais, caracterização histoquímica e estudos sobre a polinização e a microsporogênese (Alencar, 1941; Kuhn et al. 2009), prefertilização e o desenvolvimento de embriões zigóticos de *A. angustifolia* (Shimoya, 1962; Guerra et al. 2008; 2012).

1.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E ECOLÓGICA

Araucaria angustifolia é fonte valiosa de vários produtos madeireiros e não-madeireiros, dentre os quais destacam-se a madeira em tora e a semente (pinhão) (Hoeflich, 2003), consumida por seres humanos e fauna selvagem (Guerra et al. 2000). É a conífera de maior interesse econômico e ecológico do sul do Brasil (Guerra et al., 2002), representando a madeira nativa mais explorada até a década de 1970 (Astarita e Guerra, 1998). Nas estações de outono e inverno, a coleta do pinhão serve como um importante recurso econômico para as comunidades coletoras e para as famílias de baixa renda (Balbinot et al. 2008; Silva e Reis, 2009).

Como resultado da exploração sem controle, foi incluída na categoria de espécie vulnerável e, mais recentemente, classificada como criticamente ameaçada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) na lista oficial de espécies vegetais ameaçadas (Guerra et al. 2008; 2012). Na Instrução Normativa (IN) nº6/2008, *A. angustifolia* aparece na Lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2008). Para a recuperação e conservação da espécie, Guerra et al. (2008; 2012) sugerem que sejam empreendidas ações de estudos ambientais associados à recuperação de áreas degradadas com início em áreas que permitam a ligação de fragmentos florestais. Steiner et al. (2008) ressaltam a necessidade do desenvolvimento de tecnologias para a conservação e melhoramento genético de espécies subtropicais de coníferas. Para a conservação da *A. angustifolia*, uma opção é a ação conjunta das técnicas de manejo convencionais dos remanescentes florestais associadas às técnicas biotecnológicas (Stefenon e Capestrano, 2009).

Dentre os critérios apresentados por Bittencourt (2007) para o estabelecimento de estratégias que visem à conservação da diversidade genética e preservação da *A. angustifolia*, foi destacada a necessidade do conhecimento da biologia reprodutiva da espécie.

A literatura disponível sobre a biologia celular e reprodutiva da *A. angustifolia* é antiga e alguns aspectos não foram descritos ou totalmente ilustrados. Muitos estudos realizados com *A. angustifolia* envolveram aspectos bioquímicos, fisiológicos e genéticos. Contudo, pouco se conhece a respeito das alterações na organização morfológica celular e ultraestrutural que ocorrem durante o processo da polinização, fertilização e o desenvolvimento dos embriões zigóticos desta espécie. Diante da importância da espécie *A. angustifolia* para a biodiversidade catarinense e do sul do país, este trabalho visou realizar a caracterização celular, morfológica e ultraestrutural das principais fases do desenvolvimento embrionário de *A. angustifolia*, desde a fertilização até o embrião maduro. Informações sobre a biologia reprodutiva e celular de *A. angustifolia* poderão contribuir para o conhecimento sobre a evolução desta espécie nativa e em estudos que associem ferramentas biotecnológicas nas áreas da genética e biotecnologia, para programas destinados a preservação desta espécie ameaçada de extinção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a caracterização morfológica e ultraestrutural do ciclo reprodutivo a partir da origem e desenvolvimento do embrião zigótico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar temporalmente o desenvolvimento do gametófito feminino e a fertilização por análises histoquímicas em microscopia de luz;
- b) Caracterizar morfológicamente a formação dos proembriões, as células da capa, embrionárias e do suspensor com o uso de análises histoquímicas e ultraestruturais;
- c) Caracterizar morfológicamente as células do meristema apical caulinar, do meristema apical radicular e os micrósporos com o uso de análises em microscopia de fluorescência, histoquímicas e ultraestruturais;
- d) Contribuir para a elucidação de etapas do ciclo reprodutivo da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As estruturas reprodutivas (megaestróbilos e microestróbilos) foram coletadas em plantas pertencentes a uma população natural de araucárias localizada no planalto serrano, na região de Curitiba (27°18'11" de latitude sul e 50°38'12" longitude oeste, a 960m de altitude), Santa Catarina, Brasil, às margens da BR-470, no Km 256. As coletas foram realizadas mensalmente durante um período de 17 meses. Por intermédio da colaboração com a Profa. Dr^a. Neusa Steiner, à época na UFSC/Curitiba, foi obtido o livre acesso a uma propriedade rural particular (gentilmente cedido por Leandro Fuck Camargo, aluno do curso de graduação em Ciências Rurais do Campus da UFSC de Curitiba-SC).

Na primeira coleta (março 2011), foram selecionadas, numeradas e marcadas 6 plantas femininas. A seleção destas plantas baseou-se principalmente na observação visual do número de megaestróbilos em desenvolvimento que poderiam fornecer material vegetal para as coletas futuras. Foram escolhidas plantas com 15 ou

mais megaestróbilos visíveis a olho nu. Posteriormente, foi identificada a necessidade de acrescentar, mesmo que esporadicamente, a coleta em outras 5 plantas que apresentavam megaestróbilos em diferentes estágios de desenvolvimento, totalizando assim 11 plantas marcadas como matrizes (Figura 2). As plantas selecionadas foram fotografadas, marcadas com uma fita numerada e identificadas com uma placa próxima à árvore. A placa informava que aquelas plantas faziam parte de um trabalho experimental da UFSC- Campus Curitibanos, no intuito de evitar a coleta irregular dos megaestróbilos em diferentes plantas matrizes.

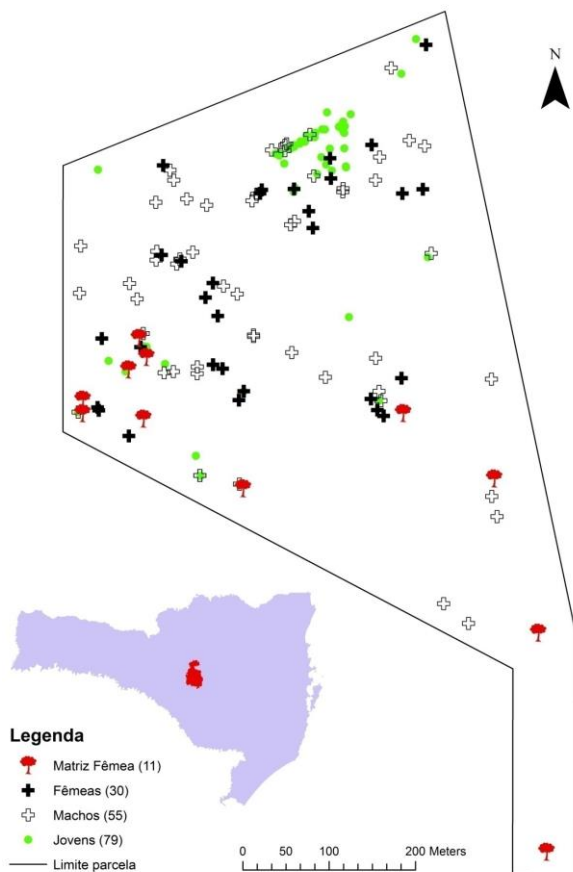


Figura 2 - Localização da propriedade rural utilizada para as coletas de material biológico de *Araucaria angustifolia*, no Km 256 da Rod. BR 470, em

Curitibanos-SC. O mapa identifica a área e marca a posição geográfica das plantas, que foram classificadas em: Matriz Fêmea (plantas de onde foram retiradas pinhas em pelo menos uma coleta); Fêmeas (plantas não utilizadas nas coletas); Machos (plantas utilizadas eventualmente e aleatoriamente nas coletas de microestróbilos) e Jovens (plantas em que não havia estrutura reprodutiva visível). (Elaboração do mapa: Felipe Steiner).

As coletas de megaestróbilos (maduros e/ou em desenvolvimento) e microestróbilos de árvores de *A. angustifolia* foram realizadas em média a cada 30 dias durante 17 meses, entre março de 2011 e julho de 2012, representando as diferentes fases do desenvolvimento do embrião (Guerra et al. 2008; 2012). Nas coletas realizadas entre março/2011 e março/2012 foram retirados sempre que possível 3 megaestróbilos maduros e 3 megaestróbilos em desenvolvimento, preferencialmente um maduro e um em desenvolvimento da mesma árvore. Em função da fase do ciclo reprodutivo da *A. angustifolia*, não foi possível em todas as coletas obter megaestróbilos maduros e em desenvolvimento das plantas selecionadas. Entre os meses de julho e outubro de 2011, foram coletados apenas megaestróbilos em desenvolvimento ou iniciais, visto que os maduros já haviam sido coletados ou haviam caído no solo.

3.2. ANÁLISE MORFOHISTOLÓGICA

3.2.1. Microscopia de luz (ML)

A histogênese e a organização celular foram monitoradas durante o desenvolvimento do embrião zigótico. Após o registro fotográfico, sementes maduras (entre 20 e 30 sementes por coleta) foram reservadas para o isolamento dos embriões e posterior fixação. Alguns megagametófitos das sementes em desenvolvimento (entre 20 e 30 sementes por coleta) também foram selecionados e posteriormente fixados. Os embriões maduros foram fixados inteiros ou, quando estavam muito grandes, tiveram os cotilédones parcialmente ou totalmente removidos. Os tegumentos da semente foram retirados antes da fixação dos megagametófitos. Para a análise histológica, as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1M) pH 7,2, na proporção de 1:1, durante 24h, em vácuo, à temperatura de 4°C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato 0,1M três vezes, por 30 min. cada lavagem (Bouzon, 1993) e desidratado em uma série de soluções aquosas de etanol em

concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina Leica® (Heidelberg, Alemanha), durante 12h; posteriormente o material foi infiltrado em historesina pura por 24h em vácuo à temperatura ambiente. A inclusão foi realizada com historesina, em moldes plásticos com adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3h (Arnold et al., 1975).

As amostras foram seccionadas em micrótomo Leica RM 2135 com navalhas de tungstênio, no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV – UFSC) por meio da colaboração da Profa. Dra. Zenilda L. Bouzon. Os cortes com espessura de 4µm foram distendidos em temperatura ambiente e colocados diretamente nas lâminas sobre gotas de água destilada sendo desidratados em placa aquecedora a 37°C por 30 min.

Os grãos de pólen foram envolvidos em agarose (A6560 Sigma – *low gelling temperature*) antes da fixação para facilitar o manuseio e processamento das amostras, que foi realizado de acordo com a descrição no item 3.2.1. A agarose foi dissolvida em água (pH 5,8) fervente, na concentração de 6g/L e quando atingiu temperatura de aproximadamente 40°C foi despejada em placa de Petri e os grãos de pólen acrescentados. Após resfriamento e geleificação da agarose em vácuo, o material foi cortado em cubos e seguiu-se o processamento para microscopia de luz (descrito no item 3.2.1.).

As observações e o registro das características qualitativas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) com auxílio do microscópio Olympus BX 40 equipado com sistema de captura de Imagens Olympus DP71 com o programa DP Controller 2002-2007.

3.2.2. Estereomicroscópio

A morfologia dos proembriões e embriões zigóticos dominantes foi acompanhada mensalmente através da dupla coloração com Azul de Evans (0,1% p/v) e Carmin Acético (2% p/v) segundo os procedimentos descritos por Durzan (1988).

3.2.3. Análises histoquímicas

As preparações histológicas e análises histoquímicas para microscopia de luz (ML) dos embriões zigóticos maduros, megagametófitos, proembriões e grãos de pólen foram realizadas de

acordo com os procedimentos descritos por Schmidt et al. (2010).

Cortes obtidos conforme o item 3.2.1. foram corados da seguinte forma: Ácido Periódico de Schiff (PAS) usado para identificar polissacarídeos neutros (Gahan, 1984); Azul de Toluidina (AT-O) 0,5% pH 3,0 (Merck Darmstadt, Alemanha), usado para polissacarídeos ácidos através de uma reação metacromática (Gordon e McCandless, 1973); Azul Brilhante de Comassie (CBB) 0,4% em solução de Clarke (Serva, Heidelberg, Alemanha), usado para proteínas totais (Gahan, 1984); Lugol, para identificação de grãos de amido (Foster, 1949). Alguns cortes foram duplamente corados com PAS + CBB (Schmidt et al. 2012a). As observações e os registros das características qualitativas foram realizadas em microscópio existente no LABCEV, da marca Leica modelo DM 500 equipado com sistema de captura de imagem ICC 50 (Leica) e software Leica Application Suite ou no equipamento Epifluorescent (Olympus BX 41) equipado com Software para captura de imagem Q Capture Pro 5,1 (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA), do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, no CCB da UFSC.

3.2.4. Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Amostras de embriões maduros isolados a partir das sementes, conforme o item 3.2.1, foram investigadas em um microscópio confocal de varredura laser (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Alemanha). Embriões maduros foram cortados manualmente no sentido longitudinal e os cortes foram montados em lâminas de vidro. Procedimento semelhante também foi realizado utilizando-se embriões (proembriões) de sementes em desenvolvimento. Neste caso, devido ao reduzido tamanho das amostras, os proembriões foram extraídos da semente e colocados inteiros sobre uma lâmina de vidro. Também foram realizadas análises dos grãos de pólen. No caso dos grãos de pólen, o procedimento incluiu apenas a colocação de uma pequena quantidade de pólen sobre uma lâmina de vidro e uma gota de água destilada. Para se estudar os núcleos nas diferentes amostras, foram adicionados 0,5 mg.mL⁻¹ DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 50 minutos (Ouriques e Bouzon, 2008). Este procedimento (adição de DAPI) não foi realizado nos grãos de pólen.

Após, as lâminas foram seladas com esmalte de unhas incolor. A fluorescência nos núcleos foi observada em diodo UV com excitação de 405 nm de comprimento de onda para visualização de DAPI e laser com emissão de espectro entre 510 a 566 nm. As análises foram feitas em

microscópio invertido fluorescente Leica TCS SP-5 (Wetzlar, Germany) com objetiva de imersão Leica HCX PLAPO lambda 63×/1.4–0.6.

Proembriões de sementes em desenvolvimento foram adicionalmente tratados com 1 μ M do fluorocromo iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) durante 30 minutos. Após este período as amostras foram excitadas em 532 nm e a detecção foi entre 595 e 730nm e analisadas em MCVL. O programa LAS-AF Lite (Leica) também foi utilizado para o processamento final das imagens confocais.

3.2.5. Microscopia de fluorescência (MF)

Proembriões foram obtidos e preparados com DAPI ou iodeto de propídio conforme descrição feita anteriormente nos procedimentos para MCVL (item 3.2.3.) e descrições metodológicas de Harris e Oparka (1994). Para análise com DAPI a fluorescência dos núcleos foi observada em microscópio Olympus BX 41 U-MWU2 com filtro azul, comprimento de onda de excitação entre 330-385 nm e emissão de espectro 420nm. Núcleos com iodeto de propídio foram observados em microscópio Olympus BX 41 U-MGW2 com filtro vermelho, comprimento de onda de excitação entre 510-550 nm e 590nm de emissão. Toda a análise de fluorescência foi realizada com um microscópio equipado com imagem Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

3.2.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os embriões zigóticos maduros foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.1., cortados (transversal e longitudinalmente) em fragmentos de aproximadamente 5 mm que incluíam a região superior do embrião, com o meristema apical caulinar. Foram fixados em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,1M). As amostras de embriões zigóticos foram desidratadas inicialmente em série etanólica com posterior substituição do solvente por CO₂ líquido, secagem em ponto-crítico (modelo EM-DPC-030, Leica, Heidelberg, Alemanha). Na análise do pólen, os grãos foram espalhados e aderidos sobre a fita de carbono no suporte metálico (*stub*) e, assim como os embriões zigóticos, sofreram pulverização catódica com ouro-paládio (Schmidt et al. 2012b) e foram posteriormente examinados em microscópio eletrônico de varredura- MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltda., Tóquio, Japão, em 10 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC).

3.3. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

3.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a observação no MET, amostras de embriões maduros com aproximadamente 5 mm de comprimento que incluíam a região superior do embrião, com o meristema apical caulinar, foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 4°C em vácuo durante a noite. Quando os embriões estavam em fases iniciais de desenvolvimento (proembriões) foram fixados inteiros. Os grãos de pólen foram envolvidos em agarose previamente à fixação, como foi descrito no item 3.2.1. O material vegetal fixado foi posteriormente lavado três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% durante quatro horas à temperatura ambiente e a 4°C por pelo menos 8h. Em seguida, foram desidratados numa série gradativa de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Para inclusão foi utilizada e resina epóxi de baixa viscosidade (Spurr, 1969). A pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 3:1 de acetona e resina, respectivamente, seguindo-se à substituição gradativa de acetona por resina até inclusão em resina pura por dois a três dias. Foram utilizados moldes horizontais como suporte, que foram colocados na estufa a 70°C, por um período de 24h até a completa polimerização (Schmidt et al. 2009). Cortes semifinos (700nm) e ultrafinos (70nm) foram realizados com Ultramicrotomo Leica Ultracut em navalha de vidro e navalha de diamante no LCME-UFSC. As telas de cobre com os cortes foram contrastadas com acetato de uranila aquoso a 2% seguido de citrato de chumbo. Duas telas de cobre foram feitas por amostras e então examinadas sob MET JEM 1011 (JEOL Ltda., Tóquio, Japão, em 80 kV). O ajuste de contraste foi realizado com o Adobe Photoshop (Yamaguchi et al. 2007).

CAPÍTULO 1

Este manuscrito segue a formatação do periódico International Journal of Plant Science

**The reproductive biology of Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*):
pollination, pre-fertilization development and proembryogeny**

Gladys D. Rogge-Renner, Neusa Steiner, Éder C. Schmidt, Zenilda L. Bouzon, Francine L. Farias-Soares, and Miguel P. Guerra.

RESUMO

A biologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, uma espécie de coníferas nativa, não é bem compreendida. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as fases do seu desenvolvimento, incluindo a morfologia do proembrião, utilizando análises histoquímicas e microscópicas. Os microestróbilos e os megaestróbilos utilizados nestes estudos foram coletados a partir de uma população natural no sul do Brasil. O pinheiro brasileiro tem um ciclo reprodutivo de cerca de dois anos, com a polinização e o início da formação do óvulo ocorrendo de setembro a outubro, a fertilização cerca de um ano depois, com sementes maduras em março do segundo ano. A célula-mãe do megásporo ou megasporócito, foi observada no nucelo em novembro do primeiro ano do ciclo reprodutivo, e o início do megagametófito com a fase nuclear livre foi observado em janeiro e fevereiro. Durante os cinco a seis meses seguintes, pouco desenvolvimento ocorre, mas após este período, o megagametófito se desenvolve rapidamente a partir de agosto, e em outubro, as arquegônias estavam maduras e a fertilização ocorreu. A partir de novembro, foram observados proembriões. A avaliação histoquímica em todas as estruturas analisadas revelou a presença de celulose na parede das células, assim como a presença de proteínas totais e de núcleos no citoplasma. Os grãos de pólen apresentaram uma superfície granular quando observados em microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de transmissão mostrou uma parede celular espessa, muitos grãos de amido e vacúolos. A microscopia eletrônica de transmissão do proembrião revelou uma parede celular fina nas células do proembrião, mitocôndrias, vacúolos, corpos lipídicos e corpos de Golgi. Tais achados sobre a biologia reprodutiva e celular de *A. angustifolia* podem contribuir para o nosso conhecimento sobre a evolução desta espécie nativa e com estudos em áreas como genética e biotecnologia para programas destinados a preservação desta espécie ameaçada.

Palavras- chave: embriogênese zigótica, microscopia, histoquímica

ABSTRACT

The reproductive biology of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, a native conifer species, is not well understood. Therefore, the present study aimed to assess its developmental stages, including proembryonic morphology, using histochemistry and microscopy analyses. The microstrobili and megastrobili used in these studies were collected from a natural population growing in southern Brazil. Brazilian pine has a reproductive cycle of two years with pollination and ovule initiation occurring from September to October, fertilization about one year later, with seeds maturing in about March of the second year. The megaspore mother cell, or megasporocyte, was observed on the nucellus in November of the first life cycle, and a free nuclear megagametophyte was observed by January and February. During the next five to six months, little development occurs, but after this period, the megagametophyte develops rapidly from August, and in October, archegonia were mature and fertilization occurred. From November, proembryos were observed. Histochemical evaluation in all structures analyzed revealed the presence of cellulose within the cell wall, as well as total proteins and nuclei in cytoplasm. Pollen grains showed a granular surface by scanning electron microscopy, and transmission microscopy showed a thick cell wall, many starch grains and vacuoles. Transmission electron microscopy of the proembryo revealed a thin cell wall on proembryo cells, mitochondria, vacuoles, lipid bodies and Golgi bodies. Such findings on reproductive and cellular biology of *A. angustifolia* may contribute to our evolutionary knowledge about this native species and with studies in areas like genetics and biotechnology to programs aimed at preserving this endangered species.

Key-words: zygotic embryogenesis, microscopy, histochemistry.

Introduction

The Araucariaceae, which contains two extant genera, including *Agathis* and *Araucaria*, is a Southern Hemisphere conifer family with a restricted distribution (Stockey 1982). The *Araucaria* genus has eighteen species (Sockey and Ko 1986) distributed throughout South America and New Caledonia, New Guinea, Australia and New Zealand (Setoguchi et al. 1998). *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, also known as Brazilian pine, is concentrated in southern Brazil (Guerra et al. 2008, Guerra et al. 2012) and is a dioecious native conifer species, rarely monoecious after trauma or disease, with unisexual structures (Reitz and Klein 1966).

The production of wood and seeds (pinion) supports its economic and ecological importance (Guerra et al. 2000, Guerra et al. 2008, Guerra et al. 2012). As a result of its wide exploitation, it was included as a vulnerable species and more recently classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2013). The conservation of *A. angustifolia* seeds is difficult because they are recalcitrant, losing viability when dried, making storage for long periods difficult (Tompsett 1984, Eira et al. 1991, Espindola et al. 1994, Farias-Soares et al. 2013).

The reproductive biology of the Araucariaceae family is not well understood, and most studies have focused on one or two species of each genus (Singh 1978). In particular, little is known about *A. angustifolia* zygotic embryo development. The available literature on the reproductive biology of *Araucaria* genus is old, and some aspects have never been described or illustrated. Some studies have investigated biochemical and physiological aspects of *A. angustifolia* zygotic embryo development (Panza et al. 2002, Astarita et al. 2003, Balbuena et al. 2009, Balbuena et al. 2011, Farias-Soares et al. 2013, Shibata et al. 2013). However, few studies have reported on cellular, histochemical and ultrastructural changes during pollination and microsporogenesis (Alencar 1941, Kuhn et al. 2009) or the prefertilization and development of *A. angustifolia* zygotic embryos (Shimoya 1962, Guerra et al. 2008, Guerra et al. 2012).

The reproductive cycle of all Araucariaceae species appears to have a two-year course, and fertilization occurs one year after pollination (Owens et al. 1995a). Conifer reproductive biology exhibits the occurrence of polyembryony, which is defined as the development of multiple embryos within a single seed (Dogra 1978, Agapito-Tenfen

et al. 2012). Only the dominant embryo gives rise to a viable plant, while the other embryos are eliminated at the beginning of late embryogenesis, as seen in *Pinus sylvestris* (Filonova et al. 2002, Bozhkov et al. 2005). The study of reproductive biology of this Brazilian native conifer species may contribute to efforts aimed at its conservation, as well as serve as a basis for comparing important features with other conifer species. Thus far, we are not aware of another study that has reported on the cellular, histochemical and ultrastructural changes that occur during the development of reproductive structures, including prefertilization and proembryo development, or characterized the different cell types that make up *A. angustifolia* polyembryos.

Therefore, this study aims to describe the morphological, histological, and ultrastructural features of pollen grains, prefertilization developmental stages and polyembryogeny in *A. angustifolia*, some of which are shown here for the first time, using optical, electron and confocal microscopy.

Material and Methods

Plant material

A. angustifolia megastrobili were collected monthly from March to November 2011, and microstrobili were collected from September to October 2011 from an open-pollinated tree in a natural population located in the county of Curitiba (960 m altitude, 27°18'11" south latitude and 50°38'12" west longitude), Santa Catarina State, Brazil. Until processing, megastrobili were kept at 4°C. Then fertile scales were individualized, and the ovules were excised to process for different microscopy techniques. The microstrobili were collected and placed on a sheet of white paper to facilitate observation of the released pollen grains, which were stored in a plastic container at 4 ° C for subsequent fixation and processing.

Morphological analyses

Proembryo morphology was monitored monthly by double staining with Evans blue (0.1% w/v) and acetocarmine (2% w/v) using procedures described by Durzan (1988). The observations were performed at the Laboratory of Developmental Physiology and Plant Genetics (LFDGV) using an Olympus BX 40 microscope equipped with Olympus DP71 capture images with the DP Controller software system.

Light microscope (LM)

Light microscopy analyses were carried out according to Ruzin (1999) and Schmidt et al. (2009). Ovules in different developmental phases (3 mm length or more) and megagametophytes without integuments (7 mm in length or more) were fixed in 2.5 % paraformaldehyde in 0.1 M (pH 7.2) phosphate buffer overnight. Subsequently, the samples were dehydrated in increasing series of ethanol aqueous solutions. After dehydration, the samples were infiltrated with Historesin (Leica Historesin, Heidelberg, Germany). Pollen grains were distributed in agarose solution (6g/L, Sigma-Aldrich; low gelling temperature) in a petri dish and solidified *in vacuo*. After gellification, the samples were cut into pieces of 0.5 cm with continued fixation and other processing steps as described above. Sections (4 μ m) were stained with different histochemical techniques: Periodic Acid-Schiff (PAS) to identify neutral polysaccharides (Gahan 1984); Toluidine Blue (TB-O) 0.5 %, pH 3.0 (Merck Darmstadt, Germany) to identify acid polysaccharides (Gordon and McCandless 1973), and Coomassie Brilliant Blue (CBB) 0.4 % in Clarke's solution (Serva, Heidelberg, Germany) to identify proteins (Gahan 1984, Schmidt et al. 2010). Some sections were double stained with PAS+CBB (Schmidt et al. 2012a). Controls consisted of applying solutions to sections without the staining component (e.g., omission of periodic acid application in the PAS reaction). LM sections were analyzed with an Epifluorescent (Olympus BX 41) microscope equipped with Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, USA).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Pollen grains were analyzed by a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany). The samples were mounted on slides with water and sealed using colorless nail polish. A Leica HCX PLAPO lambda 63x/1.4-0.6 *oil* immersion objective was fitted on the inverted fluorescent microscope. Pollen grains excited at wavelengths of 543 nm and 633 nm emitted autofluorescence. Immature embryos (proembryos) were gingerly obtained by making longitudinal cuts to the megagametophyte and mounting on glass slides. To study proembryo nuclei, 0.5 mg.mL⁻¹ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added on glass slides for 50 minutes (Ouriques and Bouzon 2008) or were treated with 1 mM of the fluorochrome propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 30 min. (Zamai et al.1996). Colorless nail polish was used to seal the glass slides. Fluorescence in the nuclei was observed in UV-diode with a 405 nm excitation wavelength for DAPI

visualization and laser emission spectrum between 510-566 nm. After 30 min with PI, the samples were excited at 532 nm with detection between 595 and 730nm and analysis by CLSM. The LAS-AF Lite program (Leica) was also used for final processing of the confocal images.

Fluorescence microscopy

Proembryos were obtained and prepared with DAPI or PI (Zamai et al.1996), as previously described for CSLM procedures. DAPI-stained nuclei were observed with the U-MWU2 (Olympus Ultraviolet Mirror Blue Wide Unit) blue filter, with excitation wavelength between 330 and 385 nm and emission spectrum at 420nm. Nuclei stained with PI were observed with a U-MGW2 (Olympus Ultraviolet Mirror Green Wide) red filter, with excitation wavelength between 510 and 550 nm and emission at 590nm. All fluorescence analyses were performed with an Olympus BX 41 microscope equipped with Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, USA).

Transmission electron microscope (TEM)

For observation under the transmission electron microscope (TEM), pollen grains or proembryos were embedded in agarose (6g/L, Sigma-Aldrich; low gelling temperature, as described for light microscopy) and fixed in 4 % paraformaldehyde with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) overnight. The material was post-fixed with 1% osmium tetroxide for four hours, dehydrated in a graded acetone series, and then embedded in Spurr's resin (Spurr, 1969). Thin sections (70 nm) were stained with aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. Two samples were then examined under TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan, at 80 kV).

Scanning electron microscope (SEM)

For SEM analysis, pollen grains were spread and adhered on a tape stuck to the stub, followed by sputter coating with gold-palladium (Schmidt et al. 2012b), drying on Critical point EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Germany), and sputter coating again with gold prior to examination (Schmidt et al. 2012b). The samples were examined under SEM JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan, at 10 kV).

Results

Microstrobili and pollen grain

In the male donor plant (fig. 1A), microstrobili (fig. 1B) collected in September 2011 showed a yellow surface, with an average length 7 cm and diameter of 2 cm. From September to October, microstrobili elongated up to an average of 15 cm in length and 3 cm in diameter, then dried and separated from the microsporophyll with their microsporangial sacs, finally shedding their pollen (figs. 1C-1E).

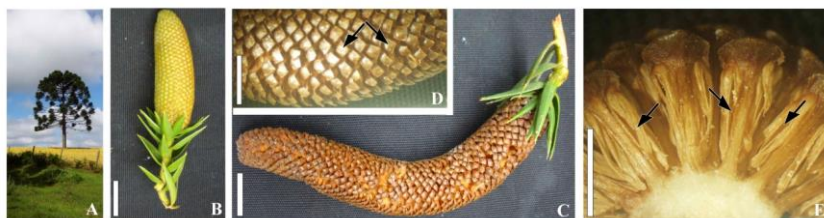


Fig. 1 General features of *A. angustifolia* male tree (A) and its mature microstrobilus (B). Microstrobili dehiscent and dry (C), featuring separate microsporophyll (arrows) (D) with open microsporangium (arrows) (E) that liberated pollen grains. The microstrobili were collected from September to October, 2011. Scale bars = 2 cm (B-C), 1 cm (D), 500 μ m (E).

At maturity, when observed under light microscopy and submitted to histochemistry techniques, the cell wall of dehiscent pollen grains was intensely stained with TB-O which showed an orthochromatic reaction, indicating the absence of acidic polysaccharides in both pollen grains and nucleus (fig. 2A). The pollen grains stained more intensely blue in the nuclei and cytoplasm when CBB was used, indicating the presence of total protein (fig. 2B) in these cellular regions. In the analyzes for this study were found up to eight nuclei per pollen grain on the same plane of histological section (fig. 2B). Neutral polysaccharides, such as cellulose and starch, were intensely stained when sections were subjected to PAS (fig. 2C) or PAS + CBB (double staining) (fig. 2D). The wall of the pollen grain stained an intense pink, as well as more than a dozen starch grains present in the cytoplasm of the cutting plane shown (fig. 2C). The double staining highlighted the presence of starch grains and cell wall, which were stained an intense pink with PAS, while the nuclei and cytoplasm were

stained blue by CBB (fig. 2D). Many vacuoles appeared in white in the pollen cytoplasm (figs. 2A-2E).

Excited at wavelengths of 543 nm and 633 nm, pollen grains emitted autofluorescence captured on CSLM from 590-650 nm (fig. 2E), showing green (fig. 2F), red (fig. 2G) and yellow (fig. 2H). The intensely colored halo observed suggests the presence of autofluorescent compounds in the cell wall of the pollen grains.

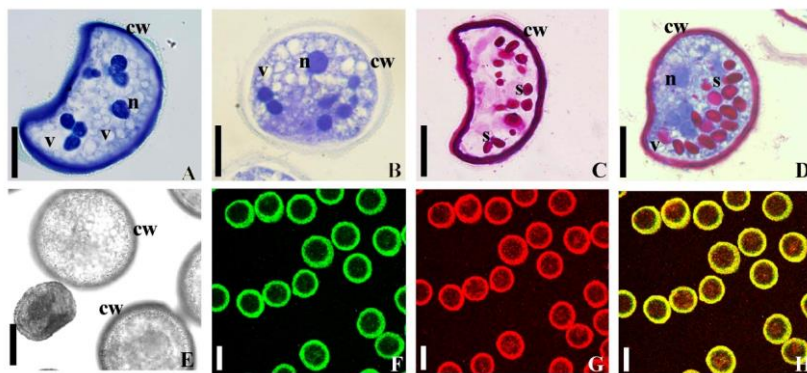


Fig. 2 Light and confocal laser scanning microscopy of *A. angustifolia* pollen grains. Stained with TB-O (A) showing the cell wall (cw) and nuclei (n) intensely stained blue and vacuoles (v) blank. When stained with CBB (B), vacuoles (v) were observed in cytoplasm and showed a pattern similar to that seen in fig. A, except for the absence of cell wall staining. The reaction to PAS (C) shows the cell wall (cw) intensely stained in pink and many starch grains (s) and vacuoles (v) in the cytoplasm. Double staining (D) showed the overlap of blue and pink colors and structures previously described in figs B and C. Pollen grains subjected to confocal microscopy excited at different wavelengths between 543 nm and 633 nm. Pollen grains with dark cell wall (cw) observed before undergoing the excitation (E) and afterwards at different wavelengths, exhibiting autofluorescence on the cell wall with green (F), red (G) and yellow (H). This figure represents pollen grains collected in September to October, 2011. Scale bars = 20 μ m (A-D), 25 μ m (E), 50 μ m (F-H).

The ultrastructural analysis of the pollen grain (figs. 3A-3E) revealed the presence of a thick cell wall composed of parallel layers externally coated by granules (figs. 3A, 3E, 3F). Compacted nuclei were evident with no apparent nucleoli (fig. 3B). Vacuoles (figs. 3B-3C), small granules and many starch grains in the cytoplasm were observed (figs. 3A-3D). Using scanning electron microscopy (SEM), the surface of *A. angustifolia* pollen grains appeared to have exine with granular sculpture (fig. 3F).

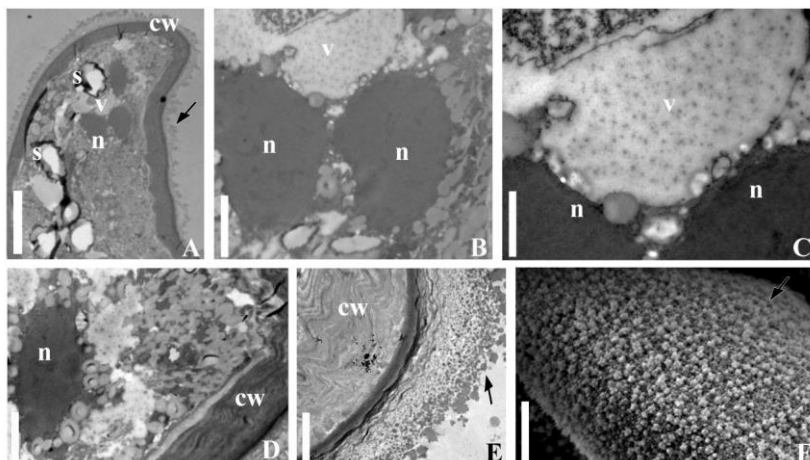


Fig. 3 Transmission and scanning electron microscopy of *A. angustifolia* pollen. Partial view showing nuclei (n), starch grains (s) and vacuole (v) (A). Detail of nuclei (n) and vacuole (v) (B-C), cytoplasmic contents with nuclei (n) and cell wall (cw) (D) and cell wall (cw) with granular surface (arrow) (E). Detail of granular surface (arrow) in SEM (F). The pollen grains were collected from September to October, 2011. Scale bars = 10 μ m (A), 2 μ m (B,D), 1 μ m (C,F), 5 μ m (E).

Megastrobili development

At the end of October, approximately one month after pollination during the first year of the reproductive cycle, the megastrobili (seed cone) had an average diameter of 6 cm and length of 9 cm with green external color (fig. 4A). The longitudinal megastrobili section shows a light beige color, both central axis and scales secured on axis (fig. 4B). At this stage, the scales were 1 cm in length, and fertile scales showed an ovule beginning development on the beige-colored end (fig. 4C) where micropyles could be seen (fig. 4D). Light microscopy of the fertile scale section shows the ovule as a lump. When stained with TB-O, no differences were observed in the intensity of ovule cell color, but an orthochromatic reaction was observed (fig. 4E).

In November, integument and nucellus were observed under light microscopy longitudinal sections, with sporogenous cells emerging on the nucellus (figs. 4F-4G). Ovule and nucellus regions with neutral polysaccharides (e.g., cellulose and starch) were intensely stained when subjected to PAS, especially the nucellus central region (fig. 4G). In the distal half of the nucellus of most ovules, an enlarged megaspore

mother cell was observed to be surrounded by numerous darkly stained sporogenous cells (fig. 4H). In response to double staining, the megaspore mother cell absorbed a little pigment, highlighting a blue central nucleus and slightly stained cytoplasm (fig. 4H). Sporogenous cells reacted strongly to PAS when double staining was used (fig. 4H). During December, in place of a megaspore mother cell, we observed an early free nuclear megagametophyte colored blue with double staining, indicating total protein presence (figs. 4I-4J). These free nuclear initial megagametophytes were also surrounded by sporogenous cells stained in pink with PAS (figs. 4I-4J).

In January or February of the following year, but still within the first year of the reproductive cycle, a clear cavity with some free nuclei arose on the central nucellus region four to five months after pollination, as observed by optical microscopy. The nucellus central region analyzed between April and July showed cells clearly organized in layers with ellipsoidal shape (fig. 4K), indicating free nuclear division upon initial megagametophyte formation. By staining with PAS (figs. 4F-4G), or double staining, (fig. 4H-4K), many starch grains and cell walls were observed in pink on sporogenous cells and outside the nucellus central cavity (figs. 4H-4K).

The cells surrounding the free nuclear initial megagametophyte were stained in pink with double staining (figs. 4K-4L). The central initial megagametophyte region analyzed from December to July 2011 showed free nuclear formation.

Cell wall formation of each free nucleus (fig. 4L) was observed only from August, with cell division and elongation filling the entire space of the central cavity with prothallial cells, which would give rise to archegonia (fig. 4L). The presence of prothallial cell wall and megaspore wall delimitation was observed when the central initial megagametophyte region was stained with TB-O (fig. 4L).

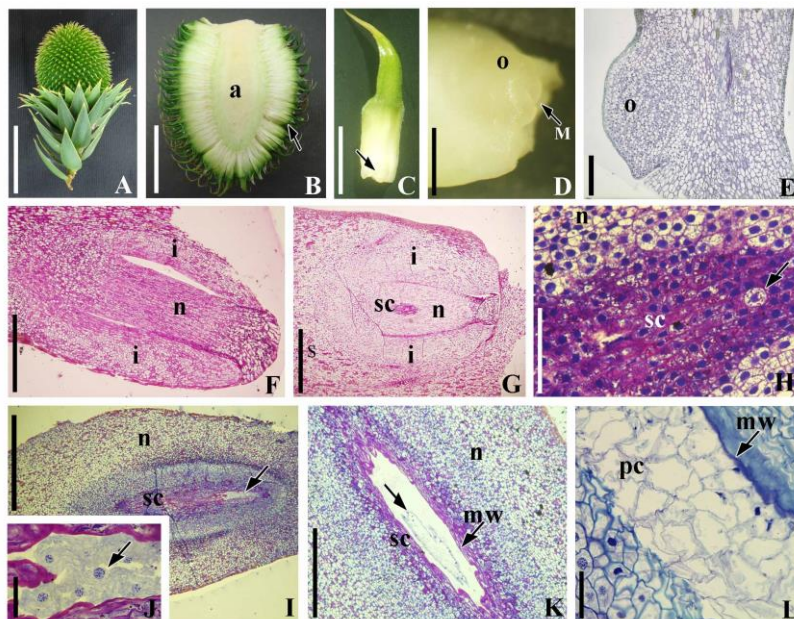


Fig. 4 Using light microscopy, general features of *A. angustifolia* megastrobili (seed cone) collected from September to October 2011 (A). Longitudinal section (B) showing axis (a) and fertile scale (arrow). Detail of fertile scale with ovule (arrow) (C) and micropyle (D). Median longitudinal sections of fertile scale under light microscopy and stained by different histochemistry techniques (E-L). Fertile scale (E), showing ovule (o). Ovule (F-G) showing integument (i), nucellus (n) and (G) also sporogenous cells (sc). Megaspore mother cell (H) (arrow) surrounded by sporogenous cells and nucellus (n). Free nuclear megagametophyte (I) (arrow) surrounded by sporogenous cells, nucellus (n) and free nuclear megagametophyte in detail (arrow) (J). Free nuclear megagametophyte showing ellipsoidal form (K) (arrow) surrounded by megaspore wall (mw), sporogenous cells and nucellus. Megagametophyte showing prothallial cells (pc) and megaspore wall (mw) (arrow) (L). Scale bars = 5 cm (A), 3 cm (B), 5 mm (C), 1 mm (D, G, I), 200 μ m (E), 500 μ m (F, H, K), 50 μ m (J, L).

Archegonial development

At the stage of archegonial formation, megastrobili (cone seed) had an average diameter of 8 cm and length of 11 cm, with external green color (fig. 5A), while scale and nucellus were beige (figs. 5B-5C). Archegonial development began to be observed on the population from the Curitibanos region approximately 13 months after pollination, from

September to early October of second year of reproductive cycle in *A. angustifolia* (figs. 5D-5E), and in October, several archegonium could be seen (fig. 5F). In early September, megagametophyte longitudinal section showed archegonium surrounded by jacket cells (figs. 5D-5E). Mature archegonium were round and usually surrounded by one or two layers of jacket cells that had denser cytoplasm when compared with megagametophyte cells (fig. 5G). The cytoplasm of jacket cells became less vacuolated and stained darkly (figs. 5E, 5G). The intense blue color (figs. 5D-5F) when double stained indicates total protein presence, especially in nuclei and cytoplasm of archegonium cells. In October, several archegonium could be seen on megagametophyte, and some pollen tubes were observed on the nucellus (fig. 5F). On the micropylar nucellus region, double-stained cells showed blue and pink colors, indicating the presence of protein and many starch grains in the cytoplasm (fig. 5F). Up to six archegonium were observed in the same *A. angustifolia* megagametophyte histological plane (fig. 5F).

The archegonial egg nucleus was not centrally located, and many small- to medium-sized vacuoles were observed in the cytoplasm (fig. 5G). When stained by TB-O, jacket cells, egg nucleus and megagametophyte nucleus cells showed orthochromatic reaction, indicating the absence of acidic polysaccharides (fig. 5G). Archegonium cell wall, jacket cell walls, neck cell walls and megagametophyte cell walls were all stained pink with positive PAS reaction, indicating the presence of cellulose (fig. 5H). Neck cells also showed positive PAS reaction on many starch grains in the cytoplasm (fig. 5H). Jacket and neck cells were observed at the same time in mature archegonium, although they were not found in all same sectional plane when subjected to different histochemical techniques. Archegonia developed in all planes, but nuclei were rarely found in these sections (fig. 5H).

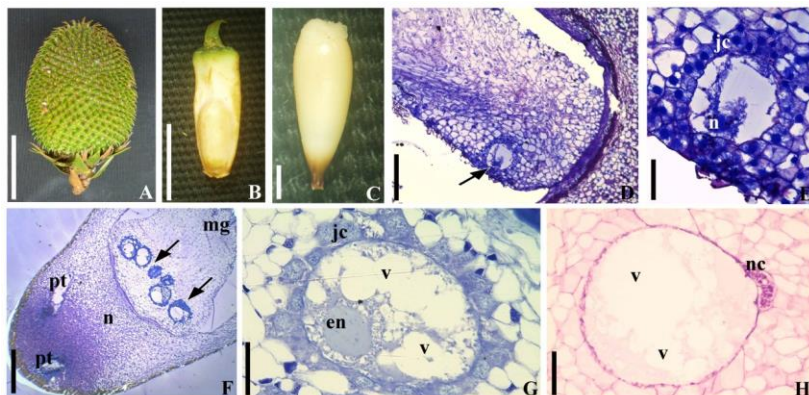


Fig. 5 General features of *A. angustifolia* megastrobili (seed cone) and light microscopy collected during the second year of reproductive cycle, from September to early October 2011 (A). Fertile scale (B) with nucellus (C). Longitudinal sections of fertile scale as seen under light microscopy and stained with different histochemistry techniques (D-H). Megagametophyte (D) and one archegonium (arrow) (E) stained with double coloration. Megagametophyte (mg) stained with double coloration with six archegonia (arrow) on nucellus (n) showing two pollen tubes (pt) growing (F). One archegonium stained with toluidine blue (TB-O) with egg nucleus (en), vacuoles (v), jacket cells (jc) (G) and archegonia stained with periodic acid-Schiff showing vacuole (v), nuclei (n) and neck cells (nc) (H). This figure represents events that occur approximately fourteen months after pollination. Scale bars = 5 cm (A), 1 cm (B), 1 mm (C), 200 μ m (D), 500 μ m (F), 50 μ m (E, G-H).

Proembryogeny

After fertilization, in the second year of the reproductive cycle, at the end of November, the megastrobilus (seed cone) has an average diameter of 25 cm in diameter, length of 13 cm, and weight of 300g, with green external color (fig. 6A). At this stage, seeds are 4 cm in length and beige in external color (fig. 6B). Inside the seed, the megagametophyte presented opaque white coloration on the mycophylar end, and translucent color in the opposite side (fig. 6C). Near the mycophylar region, three proembryos were observed on the opaque white ends (fig. 6D). This number of supernumerary embryos reveals the occurrence of polyembryony, which is a common feature in the reproductive biology of conifers. In the present work, such supernumerary zygotic proembryos were observed to form during early seed development. The formation of three proembryos was observed emerging from the archegonium on the same megagametophyte (fig.

6D) in one seed in November 2011. The proembryonic stage was characterized by the presence of multiple zygotic proembryo cell types in the apical region, specifically, embryonic and cap cells, both reactive to cetocarmine and stained in red (figs. 6D-6E). On the zygotic proembryo apical region, cap cells covered the embryo cells. Megagametophyte cells became more stained with Evan's blue (fig. 6D). A long tail was formed by suspensor cells reactive to Evan's Blue in the basal region (fig. 6E).

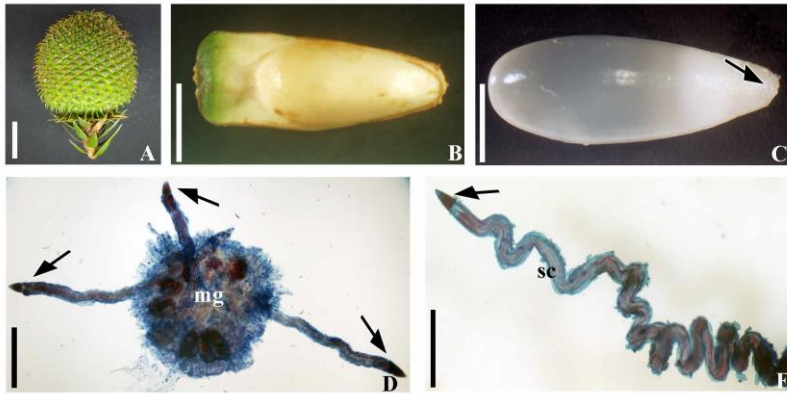


Fig. 6 General features of *A. angustifolia* megastrobili (seed cone) and microscopy during the second year of the reproductive cycle, collected in November (A). Developing seed (B) and megagametophyte without teguments showing mycophylar end (arrow) on opaque white region (C). See three proembryos dissected (arrows in D) leaving the megagametophyte (mg) stained with acetocarmine and Evan's Blue. Proembryo stained with acetocarmine and Evan's Blue with cap cells, embryonic cells (arrow), and suspensor cells (sc) (E). This figure represents events that occur approximately fifteen months after pollination. Scale bars = 5 cm (A), 1 cm (B), 3 mm (C), 500 μ m (D), 1 mm (E).

Proembryonic morphological organization was characterized by apical-basal bipolarity (fig. 7A). Three different cell types were noted: cap, embryonic and suspensor cells (fig. 7A). In the apical region, the arrangement of cap cells reveals a triangular morphology (figs. 7A-7B). The nuclei and cytoplasm of all three cell types stained blue, indicating the presence of total protein when stained with CBB, especially in embryonic and cap cells (figs. 7A-7C). With the use of TB-O, cap and embryonic cell nuclei stained intensely, but cytoplasm and cell walls stained less intensively, indicating orthochromatic reaction (figs. 7D-7F). Central cap cells were elongated with a narrow base (figs. 7D, 7F).

Lateral cap cells were shorter, with wide base and narrow apex, and nuclei were compressed and small (figs. 7D, 7F). Vacuoles were present in the cytoplasm of apical and lateral cap cells and appeared white with TB-O (figs. 7D, 7F). Embryonic cells were smaller compared with other cell types. They were polyhedral, with large central nuclei showing active chromatin (visible phases of mitosis) and small vacuoles in the cytoplasm (figs. 7D-7E). In response to PAS or double staining, the cell wall of cap cells appeared thicker on the cells' sides when compared to the cell wall of embryonic cells (fig. 7G). Some starch grains could be seen in the cytoplasm of embryonic cells. Double staining showed blue nuclei and cytoplasmic protein content of cap and embryonic cells with cell wall and starch grains in pink (fig. 7H).

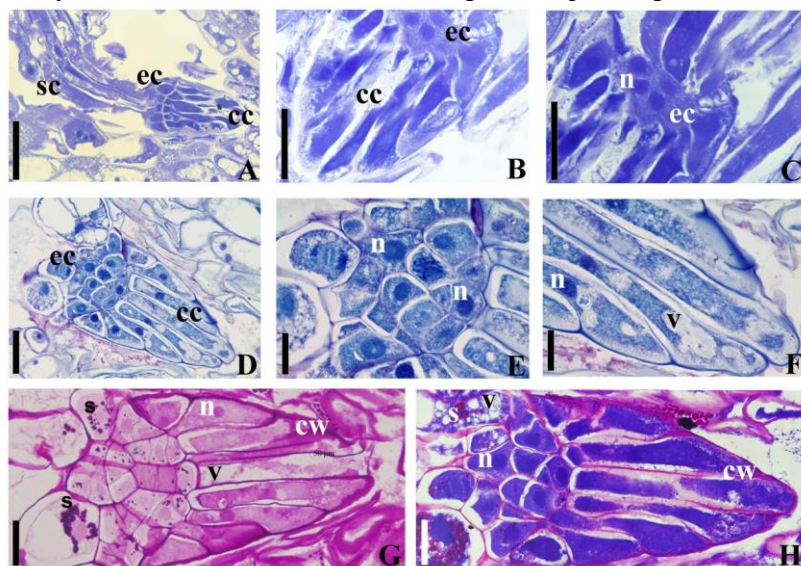


Fig. 7 Light microscopy of *A. angustiolia* proembryonic cells. Sections of a dominant embryo stained with CBB (A-C) showing three distinct regions, including suspensor cells (sc), cap cells (cc) and embryonic cells (ec), with visible nuclei (n) (C). Sections stained with TB-O (D-F) showed large central nuclei (n) (E-F) and vacuoles (v) (F). When PAS was used (G), starch grains (s) were observed in embryo cells, and the cell wall (cw) was intensely stained. Double staining (G, H), showing blue color, which indicates protein in the cytoplasm, nuclei (n) and vacuoles (v). This figure represents events that occur approximately fifteen months after pollination. Scale bars = 100 µm (A), 50 µm (B-D), 20 µm (E-H).

Proembryo development occurs inside the megagametophyte where some megagametophyte cells die and a cavity emerges (fig. 8A). Basal proembryo region was formed by long cells, vacuolated, degenerating cytoplasm, peripheral and compacted nuclei when present and irregular cell wall (figs. 8A-8F). When present, nuclei appear slightly stained with CBB in suspensor cells as well as cytoplasm (fig. 8B). The irregular cell wall thickness was detected with PAS (figs. 8D, 8E). When double stained, cytoplasm of suspensor cells stained blue, showing the presence of total proteins, and the cell wall stained purple, showing a mixture of colors occurring by the presence of total proteins and cellulose in the cell wall (fig. 8F). In the basal proembryo region, suspensor cells were elongated and parallel (figs. 8B, 8C, 8D, 8E, 8F).

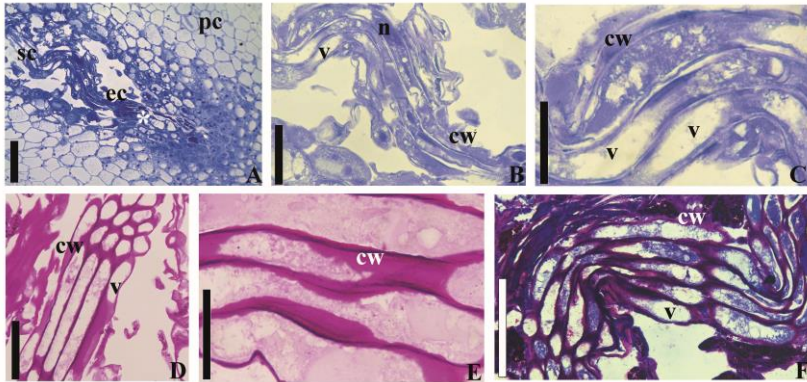


Fig. 8 Light microscopy of *A. angustiolia* polyembryo cells. Sections of a dominant embryo stained with CBB (A-C), showing proembryo (A) with cap cells (*), embryonic cells (ec) and suspensor cells (sc) surrounded by prothallial cells (pc) and suspensor cells showing cytoplasmic and nuclear (n) protein content in blue with many vacuoles (v) (B-C). Sections stained with PAS (D-E) showed irregular shape of the cell wall (cw) and vacuoles (v) (D-E). The purple color (F) results from double staining with PAS-positive reaction in the cell wall (cw) and vacuole (v). Scale bars = 500 µm (G), 200 µm (A,H), 100 µm (B,E,I), 50 µm (C-D,F).

Under confocal microscopy, DAPI staining only showed nuclei in embryonic cells (Figs. 9A, 9C). No characteristic nuclei were observed with this technique in cap or suspensor cells. Stained material appears in suspensor cells without characteristic nuclei formation, suggesting nuclear death (Figs. 9A, 9B). When subjected to reaction with PI, which is absorbed by cells in death, cells reacted positively,

most likely indicating a subordinate proembryo in regression (Figs. 9D, 9E).

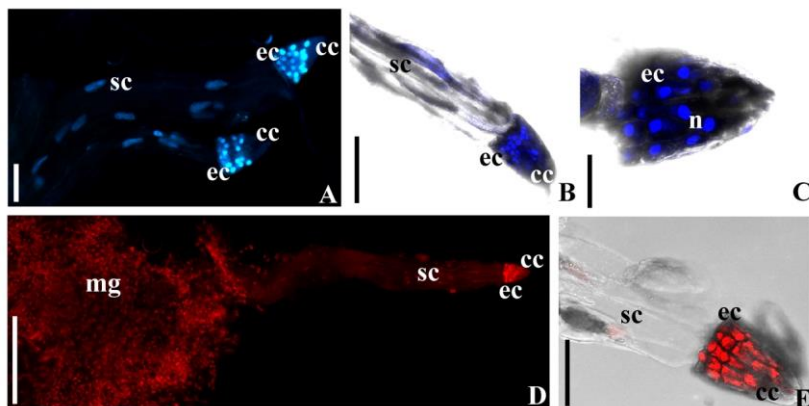


Fig. 9 Fluorescence and confocal microscopy of *A. angustiolia* proembryos. Proembryos under fluorescence microscopy with DAPI (A) and PI (D). Proembryos under confocal microscopy with DAPI (B-C) and with PI (E), showing cap cells (cc), suspensor cells (sc) and embryonic cells (ec) (A-E) with nuclei (n) (C) and megagametophyte (mg) (D). Scale bars = 100 μ m (A-B,E), 200 μ m (D), 50 μ m (C).

Ultrastructurally, the three regions of the proembryo, including cap cells, embryonic cells and suspensor cells (figs. 7A, 9A-9B, 9D-9E), differ. Cap cells (figs. 10A-10C) had thin cell walls and dense cytoplasmic contents in the central region (fig. 10A), including starch grains, large and elongated central nucleus with nucleoli. It was not possible to differentiate heterochromatin (fig. 10B). In the peripheral region close to the cell wall, the cytoplasm appeared disorganized with vacuolated cytoplasm (figs. 10B-10C), but it was possible to identify large numbers of mitochondria, vacuoles and Golgi bodies (fig. 10C). Embryonic cells (figs. 10D-10F) appeared to be meristematic, with large nucleoli in central nuclei where euchromatin and heterochromatin could be distinguished (figs. 10D-10F), along with many mitochondria (fig. 10E) lipid bodies in the cytoplasm, and a very thin cell wall (fig. 10F).

Cytoplasmic content of suspensor cells (figs. 10G-10I) presented a thicker cell wall (fig. 10G) when compared to cap and embryonic cells. The cytoplasmic content appeared disorganized and highly vacuolated (figs. 10G-10H) such that it was possible to identify many mitochondria, Golgi bodies, rough endoplasmic reticulum and vacuoles (figs. 10 H, 10I).

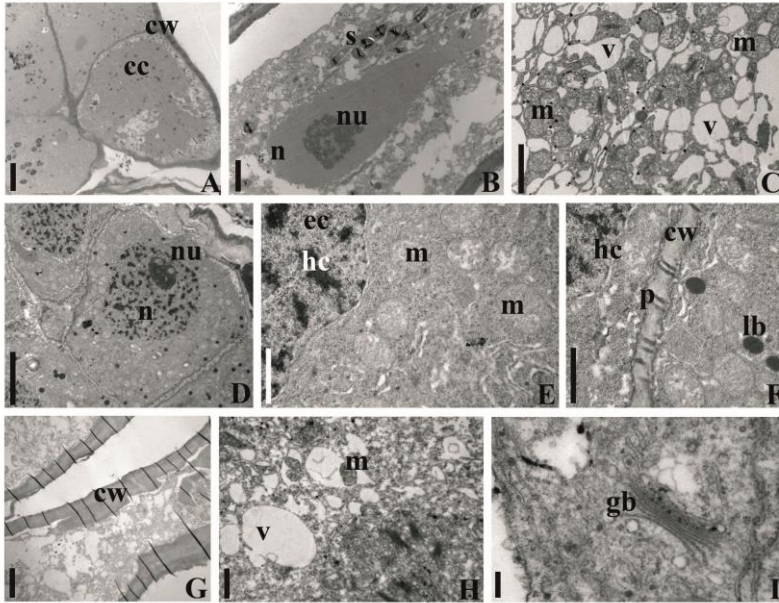


Fig. 10 Transmission electron microscopy images of *A. angustifolia* proembryonic cells in TEM. Flank cap cells (cc) (A-C) showing thick cell wall (cw) (A), nuclei (n) with nucleoli (nu) and cytoplasmic contents, including starch grains (s) (B), vacuoles (v) and mitochondria (m) (C). Embryonic cells (D-F), showing nucleus (n), nucleolus (nu) (D), euchromatin (ec), heterochromatin (hc), and cytoplasm with mitochondria (m) (E), cell wall (cw), lipid bodies (lb) and plasmodesmata (p) (F). Suspensor cells (G-I) with cell wall (cw) (G), cytoplasmic contents, showing vacuoles (v), mitochondria (m) (H), rough endoplasmic reticulum (er) and Golgi bodies (gb) (I). Scale bars = 5 μm (A-B, D-E, G), 2 μm (C), 1 μm (F, H), 0.2 μm (I).

Discussion

Araucaria angustifolia have a reproductive cycle of almost two years (about 20 months) from pollination to seed and cone maturity, similar to other members of the Araucariaceae family (Singh 1978; Haines 1981; Owens *et al.* 1995).

A. angustifolia is a dioecious species and the adult male or female plant produces microstrobili or megaestrobili, respectively, which are reproductive structures. The microstrobili consist of scales or microsporophylls attached to a central axis (Reitz and Klein 1966; Mattos 2011) as was showed here for *A. angustifolia*. In conifers, microsporogenesis starts from meiosis of a microsporocyte (or pollen mother cells) that are located inside microsporophylls producing four haploid microspores (Ferguson 1904; Korol *et al.* 1994; Williams 2009). The tetrad breaks and each one of the four microspores develop a cell wall and form a pollen grain (Williams 2009).

Some studies in Brazil described the onset of pollination in *Araucaria angustifolia*, such as Shimoya (1962), Mantovani *et al.* (2004) and Anselmini and Zaneti (2008). According Shimoya (1962), the onset of pollination in Viçosa, State of Minas Gerais, in Brazil, occurred at the end of September, while Mantovani *et al.* (2004) observed in the State of São Paulo, released of pollen grains in August and September. In southern Brazil, this phenomenon occurs between the months from August to October (Anselmini and Zaneti 2008), very similar to that was also observed for *A. angustifolia* in this work. This pollination period for *A. angustifolia* can be longer, depending on climatic conditions (Guerra *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2012).

Microsporogenesis and pollen grains features of *A. angustifolia* were described initially by Burlingame (1913) and Alencar (1941). According to Burlingame (1913), *A. angustifolia* pollen grain is shed with prothallial numerous nuclei, stalk nucleus, tube nucleus, cell body and free in it. Alencar (1941) observed that pollen grain can be released with up to twenty four prothallial nuclei. Morphological and structural aspects were partially presented in those papers for lack of technological tools and analysis available at the time of the completion of studies. More recently, the ultrastructure of pollen grain of *A. angustifolia* were described by Fueyo *et al.* (2008), who observed pollen surface formed by granular ectexine and lamellated endexine. According to Kuhn and Mariath (2014), histochemical analysis of *A. angustifolia* pollen sporoderm showed the most simplified intine structure among the group

when compared to other conifer families, with suboblate form and without apertures or air sacs.

In all conifers, the pollen grain is carried by the wind (Williams 2009) and deposited anywhere on the fertile scale of the megastrobili and starts germinating *in situ* (Guerra *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2012). The germination of *A. angustifolia* pollen grains was observed in the months from October to December (Shimoya 1962). Hydrolysis of starch grains on nucellar cells occurred above the pollen tube growth in *Agathis australis*, other species of Araucariaceae family (Owens *et al.* 1995) and was also observed for *A. angustifolia* in this work. Nucellus and micropyle seem to produce the same chemotropic substances that cause the growth of the pollen tube in their direction, irrespective of the position of the pollen grain (Singh 1978).

Pollen tubes penetrate the nucellar tip and remain there without penetrating more deeply during free nuclear period (Owens *et al.* 1995). Pollen tubes were also observed on *A. angustifolia* nucellus during free nuclear period in this work.

The megastrobili are composed of megasporophylls or fertile scales and bracts, attached to a central axis. In the megasporophylls develops the ovule, also called megasporangia. In conifers, megasporogenesis is the megaspore mother cell (megasporocyte) meiosis giving rise to four megaspores. Only the closest megaspore of the chalazal edge survives, undergoes mitosis and becomes multicellular, forming the megagametophyte as was described for *A. australis* (Owens *et al.* 1995), *Pinus* sp. (Williams 2009), *A. angustifolia* (Burlingame 1915; Johansen 1950; Shimoya 1962; Mattos 2011) and observed in this work.

The initial stage of megagametophyte within the nucellus in *A. australis* is marked by free nuclei presence, ellipsoid form and cell wall formation for each free nuclei initially formed (Owens *et al.* 1995), described similarly for *A. angustifolia* (Shimoya 1962) and was observed in this work. Megagametophyte formation in *A. australis* reported a five to eight months period of free nuclear multiplication (Owens *et al.* 1995), similar to that was observed in this work for *A. angustifolia*. Megastrobili became dormant from May in *A. australis*, pausing nuclear division (Owens *et al.* 1995). A similar observation was reported for *A. angustifolia* megastrobili, in which a state of dormancy was noted from May to July (Shimoya 1962).

After the dormancy period related for *A. australis*, cell walls were formed on free nuclei, divisions cells return, give rise to prothallial cells and formed mature megagametophyte (Owens *et al.* 1995). The

description that was made to *A. australis* is according to what has been observed in this work for *A. angustifolia*.

Simultaneously with the initial formation of the megagametophyte is the beginning of pollen tubes penetration on nucellus. The pollen tubes grow in the nucellus and cause cell destruction, which stimulate the production of some substances, probably hormonal determinant of cell division, resulting in the formation of prothallial cells (Shimoya 1962; Owens *et al.* 1995) and later in prothallial tissue archegonia differentiation occur and are generally numerous (Shimoya 1962), each with own egg cell. The association between the formation of archegonia and the presence of pollen tubes in the nucellus was also observed by Ferguson (1904) in species of the genus *Larix* (Mill.) and *Pinus* sp., by Owens *et al.* (1995) for *A. australis*, by Shimoya (1962) for *A. angustifolia* and was observed in nucellus sections submitted to histochemical tests made in this work.

In *A. angustifolia*, has not yet been accurately determined the time of fertilization (Mantovani *et al.* 2004; Steiner 2005b; Guerra *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2012), but Shimoya (1962) has observed that in Viçosa (State of Minas Gerais, Brazil) fertilization occurs from October to December. In *A. australis*, fertilization occurs in late October, followed by a brief proembryo stage (Owens *et al.* 1995). In the present work, we observed that fertilization in *A. angustifolia* occurred during October of the second reproductive cycle year.

The process of syngamy or union of gametes was only partially described for *A. angustifolia* (Johansen 1950; Williams 2009). Embryo development in this species follows the classic model established for *Conyferophyta* (Singh 1978), where three phases can be distinguished: a) pro-embryonic phase; b) initial embryonic phase and c) late embryonic phase.

In Araucariaceae, the zygote undergoes nuclear divisions in archegonium, yielding free nuclei which vary in number from thirty-two to sixty-four before cell wall formation during the initial stage of proembryo development and embryogenesis (Burlingame 1915; Johansen 1950; Haines and Prakash 1980; Guerra *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2012).

Morphological studies of proembryo development in *Araucaria* sp. suggested that this genus is the most primitive, when compared to *Cupressaceae*, *Pinaceae* and *Taxodiaceae*. The occurrence of (i) a prolonged free nuclei phase, (ii) presence of cap cells and (iii) the absence of proembryo cleavage supports primitiveness (Haines and

Prakash, 1980). In the present work made with *A. angustifolia*, from the three items mentioned above was only possible to observe presence of cap cells. The presence of cap cells in Araucariaceae family may have additional functions. Among these are the prevention of polyembryony by cleavage (Johansen 1950), secretion of enzymes that digest megagametophyte cells at the same time that embryo orientation is determined (Shimoya 1962), and the protection of embryo cells *A. australis* (Owens *et al.* 1995).

The zygotic embryogenesis in conifers is characterized by the presence of polyembryos or polyembryony, which is the presence of more than one embryo in the early stages of seed development (Steeves and Sussex 1989; Williams 2009). There are two basic types of polyembryony: (a) polyembryony polyzygotic and (b) polyembryony by cleavage. In (a) polyembryony polyzygotic two or more archegonia are fertilized in the same megagametophytes, and each archegonia produces a single proembryo (Gifford and Foster 1989; Williams 2009). Even within the archegonium each proembryo formed may suffer (b) cleavage by polyembryony, divided into up to eight proembryos (Steeves and Sussex 1989). In *Araucaria* sp. were observed only polyembryony polyzygotic (Gifford and Foster 1989). A recent study that analyzed morphological parameters with molecular markers reported the first evidence for cleavage polyembryony in *A. angustifolia* (Agapito-Tenfen *et al.* 2012). Shimoya (1962) found up to four polyembryos in developing *A. angustifolia* seeds. In this work, three polyembryos were imaged, although up to five of them were found when developing seeds were opened (unpublished data).

In conifers simultaneously to embryonic development, cells around the embryo in the megagametophyte collapse, forming the cavity of corrosion around the embryo and provide storage substances that are absorbed by the developing embryo. The archegonium also collapses, creating a small cavity in the megagametophyte on micropylar end of the seed (Owens 2004; Cairney and Pullman 2007). Histochemical analyzes performed in this study for *A. angustifolia* identified the presence of reserve substances such as starch and proteins in the cells surrounding the developing proembryo.

The identification of fully formed proembryos in *A. angustifolia* becomes possible only 14 months after pollination, shortly before the onset of regression of subordinate embryos (Mantovani *et al.* 2004; Steiner 2005; Anselmini and Zaneti 2008; Guerra *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2012). In *Pinus* sp. a period of about 13 months between pollination and fertilization was observed (Ferguson 1904) and in *A. australis* an

interval of approximately one year occurs between pollination and fertilization (Owens *et al.* 1995). In this work a time from thirteen to fourteen months was observed from pollination to proembryos presence in *A. angustifolia* and in early embryogeny three cell types were observed: cap cells (cc) in the upper region, embryonic cells (ec) in the central region and suspensor cells (sc) in the basal region of the embryo (Burlingame 1915; Johansen 1950; Guerra *et al.* 2008; Guerra *et al.* 2012).

From December to June, in southern Brazil, the development of the dominant embryo occurs, when the proembryo gives way to the early and late developmental stage of the dominant zygotic embryo (Steiner 2005, Guerra *et al.* 2008, Guerra *et al.* 2012). Mature seeds, however, can be found beginning in March. *A. angustifolia* is a native non domesticated species with two or more possible botanical varieties coexisting in a single region. This fact can explain the difference between the maturation stages of the female cones (Reitz and Klein 1966, Steiner *et al.* 2005, Guerra *et al.* 2008, Guerra *et al.* 2012). As a result, different stages of embryogenesis are found in those varieties. After germination, the plant takes about 15 years to reproduce (Carvalho 2003, Guerra *et al.* 2012).

Aspects of pollination, prefertilization stages and proembryo morphology of *A. angustifolia* resulted from analyses carried out in this work. Information obtained on histochemistry and the ultrastructure of proembryo cells is, to the best of our knowledge, were described here for the first time. The principal aspects observed were: the long time between pollination and pollen tube penetration on the nucellus, about 14 months for archegonium formation and maturation, presence of proembryo cap cells and similarity of development pattern with other species of the family Araucariaceae.

Acknowledgments

The authors acknowledge the staff of the Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME) of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. The authors also acknowledge Leandro Fuck Camargo and Leandro Dill for providing the immature seeds and pollen. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and the Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC). This study is part of the Ph.D. thesis of the first author.

References

- Agapito-Tenfen S, N Steiner, MP Guerra, RO Nodari 2012 Patterns of polyembryony and frequency of surviving multiple embryos of the Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze). Aust J of Bot 59(8):749-755.
- Alencar E 1941 Microsporogênese em *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze. CERES- Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Estado de Minas Gerais. Viçosa. Vol. II 12:444-458.
- Astarita LV, W Handro, EIS Floh 2003 Changes in polyamines content associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Rev Bras Bot Vol. 26 (2) 163-168.
- Balbuena TS, V Silveira, M Junqueira, LLC Dias, C Santa-Catarina, A Shevchenko, EIS Floh, 2009 Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). Journal of Proteomics 72:337-352.
- Balbuena TS, L Jo, FP Pieruzzi, LLC Dias, V Silveira, C Santa-Catarina, M Junqueira, JJ Thelen, A Shevchenko, EIS Floh 2011 Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. Phytochemistry 72:302-311.
- Bozhkov PV, LH Filonova, MF Suarez 2005 Programmed cell death in plant embryogenesis. Curr Top Dev Biol 67:135–179.
- Burlingame LL, 1913 The morphology of *Araucaria brasiliensis*. I. The staminate cone and male gametophyte. Bot. Gaz. 55, 97–114.
- Burlingame L 1915 The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Fertilization, the embryo, and the seed. Bot Gaz 59:1-39.
- Carvalho PER 2003 Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas v.1.
- Dogra PD 1967 Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in Pinaceae. Studia Forestalia Suecica 45:5–97.
- Dogra PD 1978 Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. Phytomorphology 28: 307-322

Durzan DJ 1988 Process control in somatic polyembryogenesis. Pages 8:147 in JE Hällgren. Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology. Swedish University of Agricultural Sciences.

Eira MTS, R Cunha, NA Salomão 1991 Efeito do tegumento sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Informativo ABRATES, Brasília, 1(4)77.

Espindola LS, M Noin, F Corbineau, D Côme, 1994 Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. Seed Sci Res, 4:193-201.

Farias-Soares FL, HP Burrieza, N Steiner N, S Maldonado, MP Guerra 2013 Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. Protoplasma 250:911-918.

Ferguson MC 1904 Contributions to the knowledge of the life history of *Pinus* with special reference to development of the gametophytes and fertilization. Proceedings of the Washington Academy of Sciences 6:1-202.

Filonova L, S von Arnold, G Daniel, PV Bozhkov 2002 Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. Cell Death and Differ 9:1057-1062.

Fueyo GM, Caccavari MA, Dome EA 2008 Morphology and structure of pollen cone and pollen grain of the *Araucaria* species from Argentina. Biocell 32(1):49-60.

Gahan PB 1984 Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. Academic Press, London.

Gifford EM, AS Foster 1989 Morphology and evolution of vascular plants. WH Freeman, New York.

Gordon EM, Mccandless EL 1973 Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. Pages in 111–133 Harvey, M.J., McLachlan, J. (Eds.), *Chondrus Crispus*: TNScot Inst Sci, Halifax.

Guerra M P, V Silveira V, ALW Santos LV Astarita, RO Nodari 2000

Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. Pages 457-478 in SM Jain, PK Gupta, RJ Newton, eds. Ed.). Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 6. Kluwer, Dordrecht.

Guerra MP, N Steiner, A Mantovani, RO Nodari, MS Reis, KL Santos, 2008 Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. Pages 149-184 in RL Barbieri, ER T Stumpf, eds. Origem e Evolução de Plantas Cultivadas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.

Guerra MP, N Steiner, RO Nodari et al. 2012 *Araucaria* Evolution, ontogenesis and genetic diversity. Pages 151-186 in RL Barbieri, ERT Stumpf, eds. Origin and evolution of cultivated plants. 1st edn. Brasília. IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 19 November 2013.

Haines RJ, N Prakash 1980 Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria juss*. Aust J Bot 28:511–522.

Haines RJ 1981 The embryology of *Araucaria juss*. PhD thesis, University of New England, Armidale, New South Wales.

Johansen DA 1950 Plant embryology: embryology of the spermatophyta. Massachusetts, Waltham.

Kuhn SA, AA Mastroberti, JEA Mariath 2009 Microsporogenese e microgametogenese do Pinheiro brasileiro - *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. – Araucariaceae in XXI Salao de Iniciação Cientifica da UFRGS, Porto Alegre. Resumos. Porto Alegre: Propesq - UFRGS, v. 1.

Kuhn AS, Mariath JEA 2014 Reproductive biology of the “Brazilian pine” (*Araucaria angustifolia* – Araucariaceae): development of microspores and microgametophytes. Flora 50763. DOI: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.flora.2014.02.009>>

Mantovani A, LP Morellato, MS Reis 2004 Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Rev Bras Bot 27(4):787-796.

Ouriques LC, Bouzon ZL 2008 Organização estrutural e ultra-estrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hinckia*

mitchelliae (Harvey) PC Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Rodriguesia* 59: 435-447.

Owens JN, GL Catalano, SJ Morris, J Aitken-Christie 1995a. The reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). I. Pollination and prefertilization development. *Int J Plant Sci* 156(3):257-269.

Owens JN, GL Catalano, SJ Morris, J Aitken-Christie 1995b. The reproductive biology of kauri (*Agathis australis*). III. Proembryogeny and early embryogeny. *Int J Plant Sci* 156(6):793-806.

Panza V, V Laínez, H Maroder, I Prego, S Maldonado 2002 Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. *Bot J Linn Soc* 140:273-281.

Reitz R, RM Klein 1966 Araucariáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 62 p. Flora Ilustrada Catarinense.

Shibata M, CMM Coelho, N Steiner 2013. Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at diferente stages of development. *Seed Sci Technol*. 41(2) 214-224.

Schmidt EC, LA Scariot T Rover, ZL Bouzon 2009 Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40:860–869

Schmidt EC, R dos Santos, A Horta M Maraschin, ZL Bouzon 2010 Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, 41(8):919-30.

Schmidt EC, B Pereira, R Santos, C Gouveia, GB Costa, GSM Faria, F Scherner, PA Horta, MR Paula, A Latini, F Ramlov, M Maraschin, ZL Bouzon 2012a. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after *in vitro* exposure to UV-B. *Aquat Bot*, 100:8-17.

Schmidt EC, B Pereira, R Santos, CLM Pontes, F Scherner, PA Horta, MR Paula, A Latini, M Maraschin, ZL Bouzon 2012b. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the

carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma*, 249: 353-367

Setoguchi H, TA Osawa, J Pintaud, T Jaffré, J Veillon 1998 Phylogenetic relationships within *Araucariaceae* based on *rbcL* gene sequences. *Am J Bot*, 85(11):1507-1516.

Shibatta M, CMM Coelho, N Steiner 2013 Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at diferente stages of development. *Seed Sci Technol*, 41(2)214-224.

Shimoya C 1962 Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Experimentiae*, Viçosa, 2(2):519-540.

Singh H 1978 Embryology of gymnosperms. Pages 187-241 in W Zimmerman, Z Carlquist, P Ozenda HD Wulff,eds. *Handbuch der Pflanzenanatomie* Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart

Steiner N, F do N VIEIRA, S Maldonado, Guerra MP 2005 Carbon source affects morphogenesis and histodifferentiation of *A. angustifolia* embryogenic cultures. *Braz Arch Biol Tech* 48(6):895-903.

Stockey RA 1982 The *Araucariaceae*: an evolutionary perspective. *Rev Palaeobot Palynol*, 37:133-154 133

Sockey RA, H Ko 1986 Cuticle micromorphology of *Araucaria* de Jussieu. *Bot Gaz* 147:508-548.

Tompsett PB 1984 Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. *Ann Appl Biol*, 105(3)581-586.

von Arnold S, I Sabala, P Bozhkov, J Dyachok, L Filonova 2002 Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org*, 69:233-249.

Williams CG 2009 *Conifer Reproductive Biology*. Springer. 171p.

Zamai L, Falcieri E, Marhefka G, Vitale M 1996 Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. *Cytometry* 23, 303-311.

CAPÍTULO 2

Manuscrito publicado no periódico Protoplasma

Structural and components characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo

Gladys D. Rogge-Renner, Neusa Steiner, Éder C. Schmidt, Zenilda L. Bouzon, Francine L. Farias, and Miguel P. Guerra.

RESUMO

Araucaria angustifolia, o pinheiro brasileiro, é uma conífera nativa de importância econômica, ecológica e ameaçada de extinção. O cone feminino desenvolve sementes contendo o embrião zigótico, que no estágio cotiledonar apresenta meristemas desenvolvidos. Pouco se sabe sobre a estrutura do meristema em gimnospermas. No presente trabalho, a composição e organização morfológica dos meristemas apical caulinar e radicular de *Araucaria angustifolia* foram estudadas durante o desenvolvimento embrionário, utilizando análises histoquímicas e de microscopia. A avaliação histoquímica revelou presença de celulose na parede celular, células com a presença de proteínas totais que reagem com Azul Brilhante de Comassie, grãos de amido e núcleos grandes com nucléolos evidentes no citoplasma. A microscopia eletrônica de varredura revelou a morfologia superficial do meristema apical, e tanto a microscopia de transmissão como de varredura mostraram uma parede celular fina e irregular com plasmodesmos e no interior das células, mitocôndrias e vacúolos, muitos corpos lipídicos, corpos de Golgi, bem como muitos amiloplastos com retículo endoplasmático em torno deles e grandes núcleos. Semelhantes às células de angiospermas, células do meristema apical caulinar e radicular de *A. angustifolia* exibem características pluripotentes, tais como mecanismos de comunicação intercelular e de diferenciação.

Palavras-chave: conífera, pluripotência, histoquímica

ABSTRACT

Araucaria angustifolia, the Brazilian pine, is an endangered native conifer with economic and ecological importance. The female cone develops seeds containing the zygotic embryo, which, at cotyledonary stage, shows well developed meristems. Little is known about the structure of gymnosperm meristems. In the present work, the composition and morphological organization of *Araucaria angustifolia* shoot and root apical meristems were studied during embryo development, using histochemical and microscope analyses. Histochemical evaluation revealed the presence of cellulose within the cell wall, cells with the presence of total proteins that react with Coomassie Brilliant Blue, starch grains, and large nuclei with evident nucleoli in the cytoplasm. Scanning electron microscopy showed apical meristem surface morphology, and both scanning and transmission microscopy revealed a thin and irregular cell wall with plasmodesmata and within the cells, mitochondria, many vacuoles, lipid bodies, Golgi bodies, and many amyloplasts with endoplasmic reticulum surrounding them and large nuclei. Similar to angiosperm cells, *A. angustifolia* meristem cells exhibit pluripotent characteristics, such as apparatus for intercellular communication and differentiation.

Key-words: Conifer, pluripotency, histochemistry

Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo

Gladys D. Rogge-Renner · Neusa Steiner ·
 Éder C. Schmidt · Zenilda L. Bouzon ·
 Francine L. Farias · Miguel P. Guerra

Received: 23 June 2012 / Accepted: 18 September 2012 / Published online: 27 September 2012
 © Springer-Verlag Wien 2012

Abstract *Araucaria angustifolia*, the Brazilian pine, is an endangered native conifer with economic and ecological importance. The female cone develops seeds containing the zygotic embryo, which, at cotyledonary stage, shows well-developed meristems. Little is known about the structure of gymnosperm meristems. In the present work, the composition and morphological organization of *Araucaria angustifolia* shoot and root apical meristems were studied during embryo development, using histochemical and microscope analyses. Histochemical evaluation revealed the presence of cellulose within the cell wall, cells with the presence of total proteins that react with Coomassie Brilliant Blue, starch grains, and large nuclei with evident nucleoli in the cytoplasm. Scanning electron microscopy showed apical meristem surface morphology, and both scanning and transmission microscopy

revealed a thin and irregular cell wall with plasmodesmata and within the cells, mitochondria, many vacuoles, lipid bodies, Golgi bodies, and many amyloplasts with endoplasmic reticulum surrounding them and large nuclei. Similar to angiosperm cells, *A. angustifolia* meristem cells exhibit pluripotent characteristics, such as apparatus for intercellular communication and differentiation.

Keywords Conifer · Pluripotency · Histochemistry

Abbreviations

CBB	Coomassie Brilliant Blue
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CZ	Central zone
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
ER	Endoplasmic reticulum
GB	Golgi body
LM	Light microscopy
PAS	Periodic acid-Schiff
RAM	Root apical meristem
RER	Rough endoplasmic reticulum
SAM	Shoot apical meristem
SEM	Scanning electron microscopy
TB-O	Toluidine blue
TEM	Transmission electron microscopy
ZE	Zygotic embryo

Handling Editor: Jaideep Mathur

G. D. Rogge-Renner (✉) · É. C. Schmidt
 Graduate Program in Cell Biology and Development,
 Department of Cell Biology, Embryology and Genetics,
 Federal University of Santa Catarina,
 88049-900 PO Box 476, Florianópolis, SC, Brazil
 e-mail: roggerenner@uol.com.br

N. Steiner
 Curitiba Campus, Federal University of Santa Catarina,
 89550-000 PO Box 101, Curitiba, SC, Brazil

Z. L. Bouzon
 Central Laboratory of Electron Microscopy,
 Federal University of Santa Catarina,
 88049-900 PO Box 476, Florianópolis, SC, Brazil

F. L. Farias · M. P. Guerra
 Laboratory of Plant Developmental Physiology and Genetics,
 Federal University of Santa Catarina,
 88040-900 PO Box 476, Florianópolis, SC, Brazil

Introduction

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze, known as Brazilian pine, is a native conifer of the Araucariaceae family distributed in the Southern Hemisphere and concentrated in southern Brazil (Setoguchi et al. 1998). Economic and ecological

importance comes from the production of wood and seeds (pinion), respectively (Guerra et al. 2000, 2008). A peculiar feature of conifer reproductive biology is the occurrence of polyembryony, defined as the development of multiple embryos within a single seed/embryo sac (Dogra 1978; Agapito-Tenfen et al. 2011). However, upon seed maturation, only the dominant embryo gives rise to a viable plant, while the other embryos are eliminated during the beginning of the late embryogenesis stage (Bozhkov et al. 2005).

In globular embryo stage during zygotic embryogenesis in angiosperms, the root and shoot apical meristems are established (Stahl and Simon 2005) at opposite embryo poles (Souter and Lindsey 2000). The *WUSCHEL* (*WUS*) gene is activated at the 16-cell globular stage and gives rise to shoot apical meristem (SAM) (Weigel and Jürgens 2002) and root apical meristem (RAM). Growth of meristem begins from the hypophysis cell, the root stem cell niche founder (Friml et al. 2003; Jenik et al. 2007).

In meristems, stem cells are in specific sites designated niches, where extracellular signals maintain stem cell division and prevent differentiation (Sablowski 2007). Stem cell niches are specialized microenvironments where pluripotent cells can be maintained (Tucker and Laux 2007), promoting self-renewal and differentiation (Stahl and Simon 2005). Because of meristem plasticity (Rodrigues and Kerbauy 2009), these cells can remain active for over a thousand years (Laux 2003) and plants that display totipotent stem cells can therefore adapt to different environmental conditions (Stahl and Simon 2005). Totipotency was a term used initially by Haberlandt (1902) to mean the production of the whole spectrum of cell types encountered in an organism (Weigel and Jürgens 2002). The strong interactions among stem cells creates a niche that maintains the identity and dependency of the surrounding cells (Byrne et al. 2003; Stahl and Simon 2005; Singh and Bhalla 2006). Single somatic cells are often physically or physiologically isolated when they become embryogenic (Yeung 1995; Dubois et al. 1990; Verdeil et al. 2001), thereby facilitating genomic and cellular reprogramming functions for competent embryogenesis (Williams and Fletcher 2005; Singh and Bhalla 2006). For these reasons, Verdeil et al. (2007) considered only single somatic cells as totipotent, while meristematic stem cells are considered as pluripotent since they can divide and differentiate into diverse specialized cells, even though the term pluripotent was previously used to characterize SAM meristematic cells (Sharma et al. 2003).

Several studies have attempted to understand and characterize plant cell meristems (Dodsworth 2009; Barton 2010; Stahl and Simon 2010; Wang et al. 2011). The majority of available data focused on the genetics, physiology, and development of *Arabidopsis thaliana* (Doerner 2000; Jenik et al. 2007; Nawy et al. 2008) and other angiosperms, like *Avena sativa* (Zhang et al. 1996) and *Elaeis guineensis* (Jouanin et al. 2011), whereas only a few studies are on

gymnosperms. Some of the latter described morphological features of meristems in *Pinus strobus* (Owston 1969), *Pinus banksiana* (Cecich 1977), *Pinus sylvestris* (Hejnowicz 1987), *Pinus* sp. (von Arnold et al. 2002), and *Pinus pinaster* (Tereso et al. 2007). Moreover, a recent study of *A. angustifolia* SAM briefly described the initiation of leaf development and the mucilage cells (Mastroberti and Mariath 2003).

This study aims to describe the morphological, histological, and ultrastructural features of shoot and root apical meristems of *A. angustifolia* at the cotyledon stage of zygotic embryos. The features of these cells, using optical and electron microscopy as well as histochemical analysis, are shown here for the first time. Comparisons with the cells of angiosperm meristem embryos are here included.

Materials and methods

Plant material

Megastrobili of *A. angustifolia* were collected from March to July 2011 from an open-pollinated tree in a natural population located in the county of Curitiba (960 m altitude, 27°18'11" south latitude and 50°38'12" west longitude), Santa Catarina State, Brazil. Megastrobili bearing seeds were kept at 4 °C. Seeds were individualized/isolated, and the embryos excised as samples to be processed for different microscopy techniques.

Light microscopy (LM)

LM analyses were carried out according to Schmidt et al. (2009). Zygotic embryos at cotyledonary stage (5 mm long) without cotyledons were fixed in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) containing 2.5 % formaldehyde overnight at 4 °C or room temperature for 12 h. Subsequently, the samples were dehydrated in an increasing series of ethanol aqueous solutions. Then, the samples were infiltrated with Histoiresin (Leica Histoiresin, Heidelberg, Germany).

Semi-thin sections (4 µm thick) containing both SAM and RAM were treated with different histochemical techniques. Periodic acid-Schiff (PAS) was used to identify neutral polysaccharides (Gahan 1984), Lugol to identify starch grains (Foster 1949), toluidine blue (TB-O) 0.5 %, pH 3.0 (Merck Darmstadt, Germany) to identify acid polysaccharides (Gordon and McCandless 1973), and Coomassie Brilliant Blue (CBB) 0.4 % in Clarke's solution (Serva, Heidelberg, Germany) to identify proteins (Gahan 1984; Schmidt et al. 2010). Some of the sections were double-stained with PAS + CBB (Schmidt et al. 2012a). Controls consisted of sections treated with the solutions without the staining component (e.g., omission of periodic acid in the PAS reaction). LM sections were analyzed in the Olympus BX 41 microscope

equipped with Image Q Capture Pro 5.1 Software (QImaging Corporation, Austin, TX, USA).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

SAM samples from zygotic embryos at cotyledonary stage were analyzed in a laser scanning confocal microscopy (Leica TCS SP-5, Wetzlar, Germany), with the Leica HCX PLAPO lambda 63×/1.4–0.6 oil immersion objective. For nuclei detection, 0.5 mgmL⁻¹ 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the samples during 50 min (Ouriques and Bouzon 2008) and observed using a UV light-emitting diode (peak wavelength of 405 nm excitation and spectrum emission of 510–566 nm). The LAS-AF Lite program (Leica) was used for final processing of the confocal images.

Transmission electron microscopy (TEM)

For observation in the TEM, SAM samples of zygotic embryos at cotyledonary stage (approximately 2 mm long) were fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 4 % formaldehyde and 2.5 % glutaraldehyde for 12 h (Schmidt et al. 2009). The material was post-fixed with 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 1 % osmium tetroxide for 4 h, dehydrated in an increasing series of acetone aqueous solutions, and then embedded in Spurr's resin (Spurr 1969). Ultra thin sections (70 nm thick) were collected on grids and stained with aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. Two grids were then examined in the JEM 1011 TEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 80 kV.

Scanning electron microscopy (SEM)

Zygotic embryos at cotyledonary stage, with 5 mm length and without cotyledons or with only partially removed cotyledons, were fixed for SAM observations in SEM, similarly described for TEM. The samples were also dehydrated in an ethanolic series, dried in the CO₂ Critical point dryer EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Germany), and gold sputter-coated prior

to examination (Hayat 1978 modified in Schmidt et al. 2012b) in the JSM 6390 LV SEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 10 kV.

Results

Plant material characterization

In the donor plants (Fig. 1a), the megastrobili (Fig. 1b) showed a green surface with 46 cm average diameter. Sterile and fertilized bracts (Fig. 1c) were present, but only the last one developed into seeds (arrow in the Fig. 1c). During March to July collection period, the seeds (Fig. 1d) showed a beige tegument, and the zygotic embryos were at the cotyledon stage (Fig. 1e).

LM and histochemistry

PAS staining showed a positive reaction, indicating the presence of neutral polysaccharides on SAM and RAM cells. In the cell wall, cellulosic compounds were observed and amyloplasts were distributed in the peripheral regions of the cell (Fig. 2a, b for SAM cells; Fig. 3a–c for RAM cells). This occurrence was confirmed by Lugol-stained images (Fig. 2c, d for SAM cells; Fig. 3d, e for RAM cells). The peripheral distribution and small size of amyloplasts gave rise to RAM, with a distinctly brighter color when compared with other PAS and Lugol-stained embryonic cells (Fig. 3a–d). TB-O-treated cells showed an orthochromatic reaction in the cytoplasm and a metachromatic reaction in the cell wall, indicating the presence of acidic polysaccharides (Figs. 2e, f and 3f, g). The nuclei were central and large, with heterochromatic regions predominantly, and one or two evident large nucleoli (Fig. 2e, f). Many vacuoles appeared in white (Figs. 2e–i and 3f–i). CBB staining revealed a large amount of protein across the cell cytoplasm (Figs. 2g–i and 3h, i). In response to double staining (CBB+PAS), nuclei, nucleoli, and protein stained in blue while cell walls and starch grains in pink (Figs. 2 and 3i). Both SAM and RAM cells showed a characteristic isodiametric form (Figs. 2b, d, f, h, i and 3b–e, g, i).

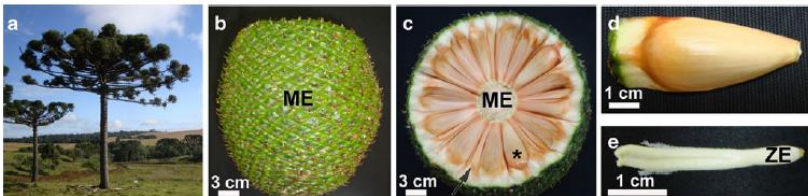


Fig. 1 General features of *A. angustifolia*. **a** Plant in the field. **b** Megastrobilus (female cone). **c** Cross section of megastrobilus showing sterile bracts (arrow) and fertilized seed (asterisk) (**d**). **e** Zygotic embryo (ZE)

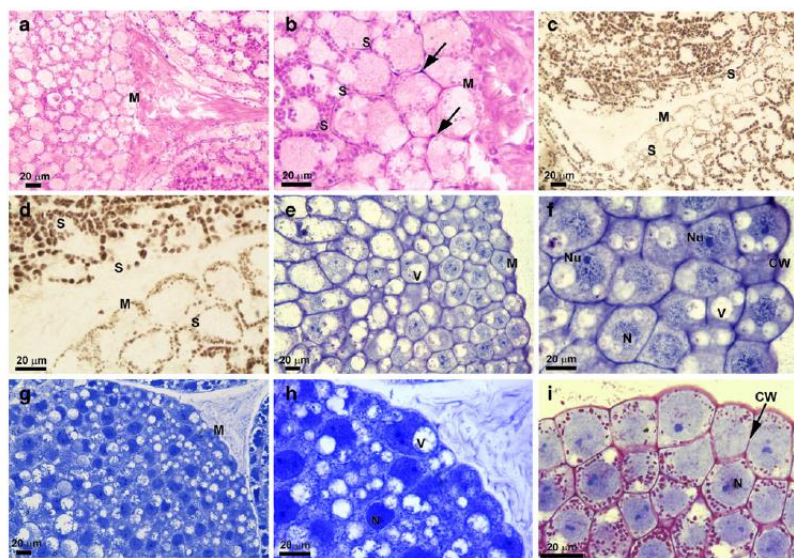


Fig. 2 Light microscopy of *A. angustifolia* SAM cells. Note the SAM sections with meristem cells (*M*) stained with PAS (**a**, **b**). Note the presence of small starch grains (*S*) in the peripheral region of the cytoplasm and the cell wall cellulosic compounds (arrows). Lugol staining (**c**, **d**) confirms the presence of small starch granules (*S*). The brighter region indicates meristem cells (*M*) in the lower region of the figures. AT-O staining (**e**, **f**) shows the presence of vacuoles (*V*) and brighter regions in meristem cells (*M*) with orthochromatic reaction in

the cytoplasm and metachromatic reaction in the cell wall (*CW*). A rather bulky nucleus (*N*) is observed with predominantly heterochromatic regions and one or two large nucleoli (*Nu*) evident. CBB staining (**g**, **h**) shows intense blue, evidencing a large amount of protein organelles in the meristem (*M*) region; vacuoles (*V*) and large nucleus (*N*) are also shown in response to double staining (PAS-CBB, **i**). Proteins are marked in blue and cell walls (*CW*) in pink

CLSM

SAM cells nuclei were strongly positive to DAPI, and the presence of a single large central and active nucleus with prominent nucleolus could be observed (Fig. 4a–c).

TEM

Similar to LM observations, SAM cells in TEM showed large central nuclei with distinguishing heterochromatin and euchromatin (Fig. 5a). Several round-shaped vacuoles (Fig. 5a), mitochondria (Fig. 5b), and amyloplasts (Fig. 5a–d) were present in the cytoplasm. The cell wall was thin with few plasmodesmata (Fig. 5b). Membrane vesicle fusion was often observed (Fig. 5b). Starch grains (ordinarily one or two in oval form) were frequently observed inside the amyloplast (Fig. 5d), which was surrounded by

RER (Fig. 5d). Lipid bodies were evident as dense bodies (Fig. 5a–c). Meristem cells typically presented one or two nucleoli (Fig. 5e–g) and many small vacuoles in the cytoplasm.

SEM

SAM cells were located in the central region and surrounded by disrupting cells arising from the cotyledons (Fig. 6a). The surface morphology associated with SAM was observed (Fig. 6a, b). The slightly irregular surface topography was characterized by the occurrence of typical isodiametric cells. When cotyledons were partially preserved in a longitudinal profile (Fig. 6c), the anatomical SAM position in the embryo was shown. A thin cell wall and the presence of small starch grains were also observed (Fig. 6d).

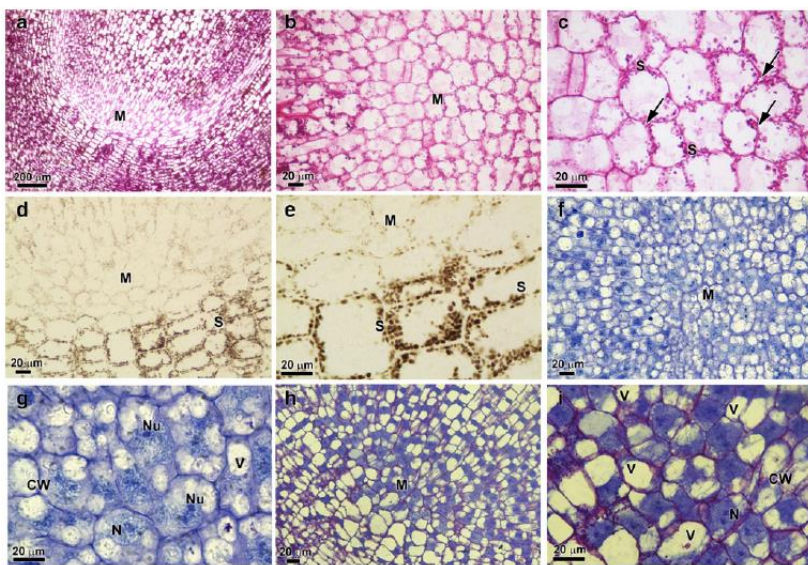


Fig. 3 Light microscopy of *A. angustifolia* RAM. Note the sections of RAM stained with PAS (a–c) with meristem (M; a, b) showing a less colored region. As in SAM, note the presence of small starch grains (S) in the cytoplasmic peripheral region and cell wall cellulosic compounds (arrows, c). Lugol staining (d, e) also shows a less colored region in meristem cells (M), in addition to small starch grains (S) seen in brown in the stem cell region and larger brown starch grains seen in

the columella region. TB-O staining (f, g), as seen in SAM, showing lighter regions in meristem cells (M), vacuoles (V), orthochromatic reaction in the cytoplasm, and metachromatic reaction in the cell wall (CW). A rather bulky nucleus (N) is observed with a predominantly heterochromatic region and one or two conspicuous large nucleoli (Nu) (h, i). Proteins in blue and cell walls (CW) in pink are observed in meristem cells (M) in response to double staining (PAS–CBB)

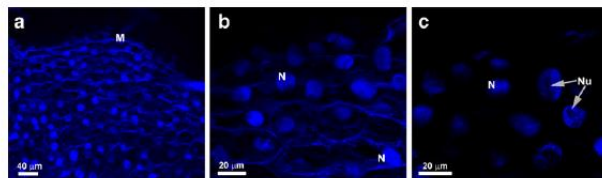
Discussion

The present study showed that the shoot and root apices meristem cells (SAM and RAM) of the conifer *A. angustifolia* analyzed in zygotic embryos at cotyledon stage had a general structure and ultrastructural organization, including isodiametric shape, with large nuclei, one or two nucleoli, and many amyloplasts, similar to those observed in angiosperms such as

oil palm (*E. guineensis*, Jouannic et al. 2011), maize (*Zea mays*, Marín-Méndez et al. 2009), and onion (*Allium cepa*, Bennici and Tani 2009).

Meristematic cells (plant cells present in meristems) are undifferentiated cells capable of self renewal, proliferation, and generation of a large number of differentiated progeny (Singh and Bhalla 2006) that gives rise to diverse tissues and organs with specific functional roles (Nieuwland et al. 2009)

Fig. 4 Confocal laser scanning microscopy images of *A. angustifolia* SAM. Observe the cross section of fresh zygotic embryo of *A. angustifolia* stained with DAPI. Overview of meristem cells (M, in a). Single large central cell nucleus (N) and nucleolus (Nu, arrows) (b, c)



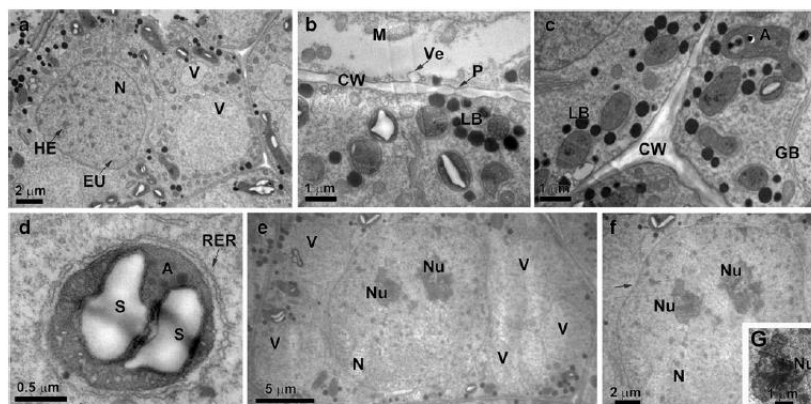


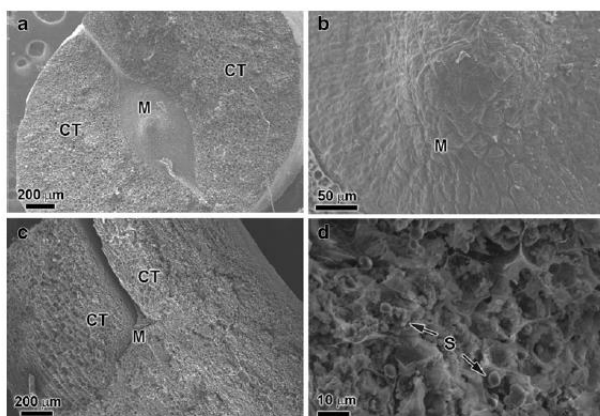
Fig. 5 Transmission electron microscopy images of *A. angustifolia* SAM. **a** Details of nuclei (*N*) with heterochromatin (*HE*) and euchromatin (*EU*) regions. Vacuoles (*V*) are also seen in **a**. Observe a vesicle (*Ve*) with cell wall (*CW*), mitochondria (*M*), plasmodesmata (*P*), and lipid body (*LB*) in **b**. Note irregular cell wall (*CW*) thickness,

amyloplasts (*A*), lipid bodies (*LB*), and Golgi bodies (*GB*) (**c**). Details of amyloplast (*A*) in the spotlight, surrounded by rough endoplasmic reticulum (*RER*) and large starch grains (*S*) inside (**d**). Vacuoles (*V*) (**e**) and single large nucleus (*N*) with two nucleolus (*Nu*) (**f**). Nuclear envelope (arrow) (**f**). Nucleolus (*Nu*) in detail (**g**)

became specialized and nonmeristematic cell. Differentiation coincides with cell enlargement and implies phenotypic specialization that is underpinned by altered gene expression patterns that eventually leads to functional divergence (Molofsky et al. 2004).

The SAM cell number in *Arabidopsis* is about 110 (Irish and Sussex 1992; Weigel and Jurgens 2002). Post-embryo shoot organs are derived from six to nine founder cells located in the apical layers of the central zone (CZ) of the SAM (Stewart and Dermen 1970). These CZ cells, also

Fig. 6 Scanning electron microscopy of *A. angustifolia* SAM. Observe the region of meristem cells (*M*) of *A. angustifolia* in SAM after removal of the cotyledons (*CT*) (**a**). Meristem (*M*) surface details (**b**). Longitudinal embryo section with cotyledon (*CT*) segment and basal location of stem cells (*SC*) (**c**). Starch grains (*S*) present in stem cells (**d**)



called SAM stem cells, proliferate slowly and are slightly more vacuolated than peripheral zone cells (Laux 2003). As mentioned above, there is a key difference in the concept of stem cell interactions, classifying meristem stem cells as pluripotent and single somatic embryogenic cells as totipotent (Verdeil et al. 2007). According to this concept, a pluripotent cell is a single stem cell giving rise to most, but not all, cell types that make up the body plant. Located within the root and shoot meristems, pluripotent plant stem cells are isodiametric with a spherically shaped nucleus containing one or more nucleoli and dense cytoplasm. Pluripotent cells present a high nucleus/cytoplasm proportion and highly vacuolated cytoplasm (Yeung 1995). Similar characteristics were observed in our *A. angustifolia* LM (see Fig. 2f, h) and TEM (see Fig. 5a, e) studies addressing the presence of pluripotent cells in SAM and RAM of zygotic embryos at cotyledon stage. Embryogenic cells of coconut calli in vitro have invaginations of the nuclear envelope and proliferation of dictyosomes, with the emission of Golgi vesicles directly related to an increase in cell wall thickness (Verdeil et al. 2001), characteristics not observed in *A. angustifolia* cells. Following the reasoning of Verdeil, coconut somatic cells are, therefore, totipotent. On the other hand, *A. angustifolia* meristem cells show different characteristics from the somatic cells of coconut, which reinforces the hypothesis that they are most probably pluripotent.

Meristematic stem cells have a thin primary cell wall and plasmodesmata connections allowing intercellular movement, such as transcription factors, which control developmental processes (Haywood et al. 2002; Ueki and Citovsky 2005; Kurata et al. 2005). In the present work, the presence of a thin primary cell wall was confirmed by LM and TEM analyses, with the presence of interconnecting few plasmodesmata, as also noted in *E. guineensis* (oil palm) SAM (Jouanneic et al. 2011). Histochemical analysis (PAS and TB-O reaction) indicated the presence of neutral and acidic polysaccharide components within the cell wall of *A. angustifolia*.

Light-stained cytoplasm and apparent vacuoles in *P. banksiana* SAM were observed under LM (Cecich 1977). Similarly, *A. angustifolia* SAM and RAM showed especially bright cytoplasm. This might be due to the light color of the small amyloplasts distributed in the cell side and the vacuoles after PAS and Lugol treatments. Compared to other embryonic cells, *A. angustifolia* meristem cells have few starch grains. In agreement with our results, low starch content was also found by Tereso et al. (2007) in the cotyledons of the *P. pinaster* zygotic embryos.

According to Verdeil et al. (2007), the nuclei of pluripotent stem cells of the meristem are generally, spherically shaped with several small nucleoli. Most of the chromatin exists as heterochromatin, uniformly distributed in the nucleus with small regions of euchromatin. According to these authors, pluripotent stem cells have no amyloplasts. In the

A. angustifolia SAM cells analyzed under TEM, some of the features described by Verdeil et al. (2007) were observed, including nuclei and nucleoli number (one to two), as well as the chromatin organization. In contrast, we observed many amyloplasts, identified by the presence of starch grains (PAS and Lugol staining) under LM, whose ultrastructural details were here described (see Fig. 5d).

Besides the cell features cited by Verdeil et al. (2007) related to pluripotency, Cecich (1977) added the presence of lipid bodies, which were also observed in our *A. angustifolia* ultrastructural analysis. Cecich (1977) observed an apparent association between lipid bodies and the endoplasmic reticulum (ER), suggesting that lipid bodies were utilized as cofactors for enzyme synthesis. Lipid bodies in meristem cells suggest a storage function (Curtis and Popham 1972).

The intense blue color observed when *A. angustifolia* meristem sections were stained with CBB or CBB+PAS refers to the presence of membranous organelles like ER and GB, voluminous nucleus, and mitochondria in the cytoplasm.

Subtle variations in descriptions associated with the features of meristem cells are encountered in the different published works that could be explained by the distinct approaches taken and only a few articles emphasize cell meristem structure. According to our results, the features associated with the pluripotent cells of *A. angustifolia* are quite similar to those described for some angiosperms (Zhang et al. 1996; Clark 1997 and 2001; Sharma et al. 2003; Jouanneic et al. 2011). Morphological differences, as stated by Verdeil et al. (2007), occur between meristem cells (pluripotent) and embryogenic somatic cells (totipotent). Although further examination of SAM cells is required considering the position of the cells within the embryo (most external and accessible), we considered that the characteristics of SAM and RAM cells of *A. angustifolia* here analyzed have morphological similarities found in the pluripotency concept.

For the first time, it is here described the novel features of *A. angustifolia* RAM and SAM organization in LM, TEM, CLSM, and SEM, respectively. The nuclei features of *A. angustifolia* are similar to those described for *Arabidopsis* (Sharma et al. 2003). Also, *A. angustifolia* SAM cells showed features similar to those observed in *A. thaliana* SAM cells studied by Clark (1997, 2001), as well as in oat (Zhang et al. 1996). The three-dimensional profile of *A. angustifolia* in SEM is comparable to the ectopic shoot meristem initial formation in the leaves of the mutant *as1* (Byrne et al. 2003).

Conclusion

The emphasis on stem cell research in plant developmental biology has been focused on the pluripotent stem cells present in the root and shoot apices. SAM and RAM both

play a pivotal role in originating most of the cells that constitute the adult plant. The results of the present work show that *A. angustifolia* embryonic meristem cells exhibit pluripotent cellular features. They also display a conspicuous apparatus for intercellular communication such as some plasmodesmata and thin cell wall, besides other characteristics as isodiametric shape, large nuclei with one or two nucleoli, organelles for protein synthesis, and storage compounds. Together, these features support the pluripotency characteristic of *A. angustifolia* embryonic meristem cells. Additionally, we postulate that the structural organization of shoot and root apical meristems of cotyledonary zygotic embryos of *A. angustifolia* does not substantially differ from those described in angiosperms.

Acknowledgments The authors acknowledge the staff of the Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME) of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. The authors also acknowledge Leandro Puck Camargo and Leandro Dill for providing the seeds. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and the Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Inovação Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC). This study is part of the Ph.D. thesis of the first author.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Agapito-Tenfen SZ, Steiner N, Guerra MP, Nodari RO (2011) Patterns of polyembryony and frequency of surviving multiple embryos of the Brazilian pine *Araucaria angustifolia*. *Aust J Bot* 59:749–755
- Barton MK (2010) Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev Biol* 341:95–113
- Bernici A, Tani C (2009) Ultrastructural effects of salinity in *Nicotiana glauca* var. *bigelovii* callus and *Allium cepa* roots. *Caryologia* 62(2):124–133
- Bozhkov PV, Filonova LH, Suarez MF (2005) Programmed cell death in plant embryogenesis. *Curr Top Dev Biol* 67:135–179
- Byrne ME, Kidner CA, Martienssen RA (2003) Plant stem cells: divergent pathways and common themes in shoots and roots. *Curr Opin Genet Dev* 13:551–557
- Cecich RA (1977) An electron microscopic evaluation of cytohistological zonation in the shoot apical meristem of *Pinus banksiana*. *Amer J Bot* 64(10):1263–1271
- Clark SE (1997) Organ formation at the vegetative shoot meristem. *Plant Cell* 9:1067–1076
- Clark SE (2001) Cell signaling at the shoot meristem. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:277–284
- Curtis JD, Popham RA (1972) The developmental anatomy of long-branch terminal buds of *Pinus banksiana*. *Amer J Bot* 59:194–202
- Dodsworth S (2009) A diverse and intricate signaling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Dev Biol* 336:1–9
- Doerner P (2000) Plant stem cells: the only constant thing is change. *Curr Biol* 10(22):826–829
- Dogra PD (1978) Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphol* 28:307–322
- Dubois T, Guedira M, Dubois J, Vasseur J (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: as callose an early marker? *Ann Bot* 65:539–545
- Foster AS (1949) Practical plant anatomy. D. Van Nostrand, Princeton
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426:147–153
- Gahan PB (1984) Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction. Academic, London
- Gordon EM, Macandless EL (1973) Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. *Proc NS Inst Sci* 27:111–133
- Guerra MP, Silveira V, Santos ALW, Astarita IV, Nodari RO (2000) Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants, vol 6. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 457–478
- Guerra MP, Steiner N, Mantovani A, Nodari RO, Reis MS, dos Santos KL (2008) Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: Barbieri RL, StumpfERT (eds) Origem e evolução de plantas cultivadas. Embrapa Inf Tecnol, Brasília, DF
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad Wiss. Wien. Math. Naturwiss. Kl. Abt J 111:69–92
- Hayat MA (1978) Introduction to biological scanning electron microscopy. University Park Press, Baltimore
- Haywood V, Kragler F, Lucas WJ (2002) Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* 14:303–325
- Hojnowicz A (1987) Changes in the development of apical meristem of *Pinus sylvestris* in response to gibberellins application. *For Ecol Manage* 19:99–106
- Irish VF, Sussex IM (1992) A fate map of the Arabidopsis embryonic shoot apical meristem. *Development* 115:745–753
- Jenik PD, Gillmor SC, Lukowitz W (2007) Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:207–236
- Jouanin S, Lartaud M, Hervé J, Collin M, Orioux Y, Verdeil J-L (2011) The shoot apical meristem of oil palm (*Elaeis guineensis*; Arecaceae) developmental progression and dynamics. *Ann Bot* 108:1477–1487
- Kurata T, Okada K, Wada T (2005) Intercellular movement of transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 8:600–605
- Laux T (2003) The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell* 113:281–283
- Marín-Méndez W, Sánchez-Chacón E, Gatica-Arias AM, Ramírez-Fonseca P, Freire-Bustamante E, Valdez-Melara M (2009) Ultrastructure and histology of organogenesis induced from shoot tips of maize (*Zea mays*, Poaceae). *Rev Biol Trop* 57(1):129–139
- Mastroberti AA, Mariath JE de A (2003) Morfologia e citologia das células compartimentadas em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (Araucariaceae). Tesis, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil
- Molofsky AV, Pardo R, Morrison SJ (2004) Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 16:700–707
- Nawy T, Wolfgrat L, Bayer M (2008) Talk global, act local—patterning the Arabidopsis meristem. *Curr Opin Plant Biol* 11:28–33
- Nieuland J, Scofield S, Murray JAH (2009) Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives. *Semin Cell Dev Biol* 20:1134–1142
- Ouwerkerk LC, Bouzon ZL (2008) Organização estrutural e ultra-estrutural das células vegetativas e da estrutura pluricelular de *Hinksia mitchellii* (Harvey) P C Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Rodriguesia* 59:435–447
- Owston PW (1969) The shoot apex in eastern white pine: its structure, seasonal development, and variation within the crown. *Can J Bot* 47:1181–1188
- Rodrigues MA, Kerbauy GB (2009) Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. *Hoechna* 36(4):525–549

- Sablowski R (2007) The dynamic plant stem cell niches. *Curr Opin Plant Biol* 10:639–644
- Schmidt EC, Scariot LA, Rover T, Bouzon ZL (2009) Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron* 40:860–869
- Schmidt EC, dos Santos R, Horta PA (2010) Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariiales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron* 41:919–930
- Schmidt EC, Pereira B, Santos R, Gouveia C, Costa GB, Faria GSM, Schemer F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL (2012a) Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquat Bot* 100:8–17
- Schmidt EC, Pereira B, Pontes CLM, Santos R, Schemer F, Horta PA, Paula MR, Latini A, Maraschin M, Bouzon ZL (2012b) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the cartagenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). *Protoplasma* 249:353–367
- Setoguchi H, Asawa TA, Pintaud J, Jaffré T, Veillon J (1998) Phylogenetic relationships within *Araucariaceae* based on *rbcL* gene sequences. *Am J Bot* 85(11):1507–1516
- Sharma VK, Carles C, Fletcher JC (2003) Maintenance of stem cell populations in plants. *PNAS* 100(11):11823–11829
- Singh MB, Bhalla PL (2006) Plant stem cells carve their own niche. *Trends Plant Sci* 11:241–246
- Souter M, Lindsey K (2000) Polarity and signaling in plant embryogenesis. *J Exp Bot* 51(347):971–983
- Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31–43
- Stahl Y, Simon R (2005) Plant stem cell niches. *Int J Dev Biol* 49:479–489
- Stahl Y, Simon R (2010) Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* 13:53–58
- Stewart RN, Dermen H (1970) Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *Am J Bot* 57:816–826
- Tereso S, Zoglauer K, Milhinhos A, Miguel A, Oliveira MM (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiol* 27:661–669
- Tucker MR, Laux T (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends Cell Biol* 17(8):403–410
- Ueki S, Citovsky V (2005) Control improves with age: intercellular transport in plant embryos and adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1817–1818
- Verdeil J-L, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferrière N, Nicole M (2001) Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann Bot* 88:9–18
- Verdeil J-L, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12(6):245–252
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *PCTOC* 69:233–249
- Wang C-Y, Chen Y-Q, Liu Q (2011) Sculpting the meristem: the roles of miRNAs in plant stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409:363–366
- Weigel D, Jürgens G (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415:751–754
- Williams L, Fletcher JC (2005) Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* 8:582–586
- Yeung EC (1995) Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic, Netherlands, pp 205–247
- Zhang S, Zhong H, Sticklen MB (1996) Production of multiple shoots from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.). *J Plant Physiol* 148:667–671

4 CONCLUSÃO

- Longo tempo entre a polinização e a penetração profunda do tubo polínico no nucelo;
- Longo tempo para formação e maturação das arquegônias;
- Fertilização no segundo ano do ciclo reprodutivo, 13 a 14 meses após polinização;
- Ausência de arquegônias para a fertilização na época da polinização;
- Núcleos livres no início da formação do megagametófito;
- Grãos de pólen multinucleados, vacuolizados, muito amido e proteínas no citoplasma, parede celular espessa com superfície granular;
- Células do meristema apresentaram características de pluripotência como as de angiospermas.

Os eventos que representam as principais etapas do desenvolvimento reprodutivo de *A. angustifolia* listados acima, aparecem sintetizados na Tabela 1 (abaixo).

Os resultados ampliam o conhecimento sobre o desenvolvimento reprodutivo de *A. angustifolia*, fornecendo informações científicas iniciais para o aprofundamento em estudos evolutivos, biotecnológicos, de melhoramento genético e programas de conservação da espécie.

Tabela 1. Fenologia do desenvolvimento reprodutivo de *A. angustifolia* entre 2010 e 2012, crescendo em Curitiba – SC, desde a polinização até a maturação da semente.

Meses	Estágio do desenvolvimento
Agosto-setembro 2010	Polinização
Janeiro-julho 2011	Núcleos livres
Julho-setembro 2011	Tecido protalial
Setembro 2011	Primeiras arquegônias visíveis
Outubro 2011	Período de fertilização
Novembro 2011	Proembriões
Dezembro 2011 a fevereiro 2012	Embrião dominante
Fevereiro a julho 2012	Maturação da semente

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A espécie *A. angustifolia* é uma conífera nativa do Brasil, apresenta grande importância ecológica e econômica para o país, esta

última quase levou a espécie à extinção pela exploração desordenada, mas seu desenvolvimento reprodutivo é pouco conhecido.

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho (dados parcialmente apresentados), foi possível complementar informações em relação ao ciclo de vida de *A. angustifolia* (Figura 1) proposto por Guerra et al. (2008; 2012). O ciclo reprodutivo proposto por estes autores mostra o esporófito adulto dióico e suas estruturas reprodutivas (megaestróbilos e microestróbilos), compostas por megaesporângios e microesporângios, respectivamente. Os grãos de pólen são liberados pelos microesporângios entre agosto e setembro do ano I do ciclo reprodutivo e depositados nas escamas ovulíferas dos megaesporângios, sem definir o momento da fecundação. A fase de núcleos livres aparece após a fertilização, seguida de alongação celular e formação dos poliembriões com suas células características (da capa, embrionárias e do suspensor). Na sequência do desenvolvimento, um embrião dominante permanece e se desenvolve até a formação da semente madura, enquanto há regressão dos embriões subordinados (Figura 1 página 18).

No presente trabalho, acrescentamos três pontos ao ciclo de vida de *A. angustifolia*. O primeiro (Ponto 1 na Figura 2) refere-se à presença de uma fase de núcleos livres na região central do nucelo, no início da formação do megagametófito. O ciclo reprodutivo descrito por Guerra et al. (2008; 2012) remete à pergunta do momento da fecundação. O segundo (Ponto 2 na Figura 2) refere-se à definição do momento da fecundação, que em 2011 na população estudada foi em outubro do ano II do ciclo. Análises histológicas (dados não apresentados) sugerem que os grãos de pólen germinam penetrando na escama ovulífera logo após a polinização (ano I) e entram em uma espécie de dormência, já que não há no momento arquegônia disponível para fertilização. Paralelamente, dentro da escama ovulífera, mais precisamente na região central, iniciou-se a formação do nucelo onde surgiu a célula mãe do megásporo rodeada pelas células esporogênicas, e a formação de uma cavidade com núcleos livres, visíveis entre os meses de janeiro e julho de 2011. O terceiro (Ponto 3 na figura 2) refere-se à caracterização das células meristemáticas apicais caulinares e radiculares do embrião dominante na fase cotiledonar, que até então não tinham alguns de seus aspectos histoquímicos, celulares e ultraestruturais conhecidos.

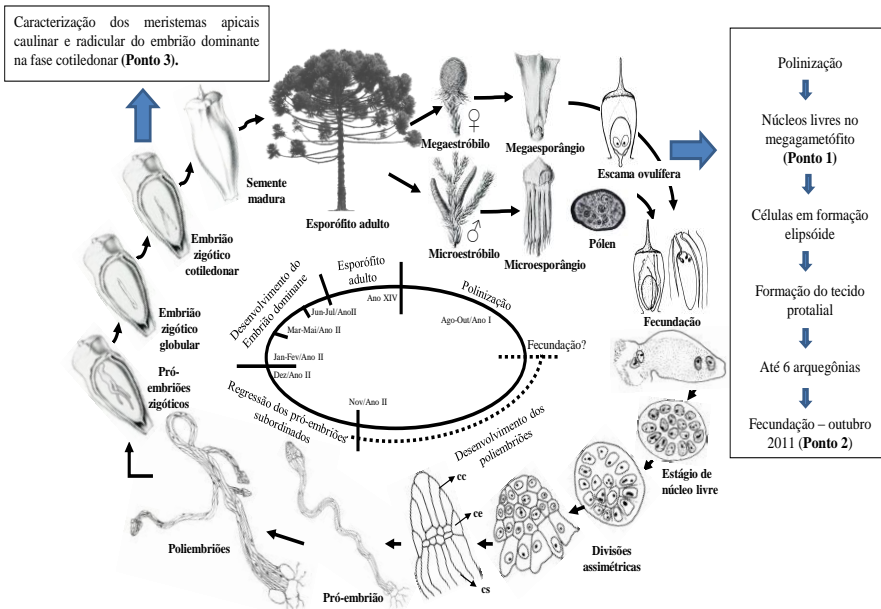


Figura 3. Representação do ciclo de vida de *A. angustifolia* apresentado por Guerra et al. (2008; 2012) com adaptações.

Entre os meses de abril e julho, as células centrais do megagametófito formaram uma organização celular elipsóide. Em agosto os núcleos livres já apresentavam parede celular e estavam organizados formando um tecido homogêneo composto por células protaliais que preenchiam a cavidade. A partir de setembro as arquegônias começaram a ser observadas na região próxima à micrópila, dentro do tecido protalial. Foi identificado que o início da formação dos embriões ocorreu em outubro de 2011, no ano II do ciclo, portanto a fecundação naquela população ocorreu entre 13 a 14 meses após a polinização. Após a fecundação, o embrião passou por uma fase de núcleos livres, seguida por divisões celulares assimétricas (dados não apresentados) até a formação dos proembriões. Depois da fase proembrionária, os embriões subordinados regrediram e apenas um embrião, na maior parte das sementes que foram abertas, permaneceu e se desenvolveu até a semente madura (Figura 2).

Outras etapas foram realizadas e não incluídas neste trabalho, como a caracterização do embrião dominante nas fases embrionária inicial e tardia. Estão sendo selecionadas imagens, dentre as que foram obtidas, que sejam representativas da organização morfológica característica de cada uma destas etapas e será feita a descrição do embrião dominante de *A. angustifolia*. A quantificação e qualificação por cromatografia líquida de alta eficiência dos carboidratos presentes nos embriões e no endosperma ao longo do desenvolvimento também foi realizada e ocorreu em parceria com a UENF-RJ. Os dados obtidos foram planilhados, interpretados e os resultados estão sendo redigidos na forma de um artigo científico. Os resultados mencionados acima, embora não apareçam neste documento, serviram de base para a compreensão do desenvolvimento embrionário como um todo e foram essenciais para o entendimento dos temas apresentados nos capítulos que compõem a tese.

Os resultados apresentados são importantes para ampliar o conhecimento a respeito do desenvolvimento reprodutivo de *A. angustifolia*, podendo ser utilizados para ampliar o conhecimento sobre a biologia reprodutiva da espécie e fornecendo informações científicas iniciais para o aprofundamento em estudos evolutivos, biotecnológicos, de melhoramento genético e programas de conservação da espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPITO-TENFEN S.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. 2012. **Patterns of polyembryony and frequency of surviving multiple embryos of the Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze).** Aust J of Bot 59(8):749-755.
- ALENCAR E. 1941. **Microsporogênese em *Araucaria angustifolia* (Bertolini) O. Ktze.** CERES- Escola Superior de Agricultura e Veterinária do Estado de Minas Gerais. Viçosa. Vol. II 12:444-458.
- ANSELMINI, J. I. 2005. **Fenologia reprodutiva da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, na região de Curitiba – PR.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 88 p.
- ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. 2008. **Development and Growth Curve of the Pine Cones of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, in the Region of Curitiba – PR.** Brazilian Archives of Biology and Technology – An International Journal, 51(4): 665-669.
- ANSELMINI, J. I. 2008. **Microenxertia e polinização controlada em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná.
- ARNOLD, C.D.; MITRENGA, D.; MAYRESBACH, H. 1975. **Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA) – Ergebnisse Histochemischer Reaktionen.** Acta histochemistry, 14:271-277.
- ASTARITA, L. V.; GUERRA, M. P. 1998. **Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass culture.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 10:113-118.
- ASTARITA, L. V.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. 2003 **Changes in polyamines contente associated with zygotic embryogenesis in the Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Rev Bras Bot Vol. 26 (2) 163-168.
- BALBINOT, R.; GARZEL, J. C. L.; WEBER, K.S.; RIBEIRO, A.B. 2008. **Tendências de consumo e preço de comercialização do pinhão**

(semente da *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze.), no Estado do Paraná. In: *Ambiência*, Guarapuava-PR, v. 4, n. 3, p. 463-472, set./dez.

BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; JUNQUEIRA, M.; DIAS, L. L. C.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. 2009. **Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilina Pine (*Araucaria angustifolia*)**. *Journal of Proteomics* 72:337-352.

BALBUENA, T. S.; JO, L.; PIERUZZI, F.P.; DIAS, L. L. C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; JUNQUEIRA, M.; THELEN, J. J.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. 2011. **Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia***. *Phytochemistry* 72:302-311.

BITTENCOURT, J. V. M. 2007. **Proposta para conservação genética da *Araucaria angustifolia***. *Pesq. Flor. Bras.*, Colombo, n. 55, p.87-93, jul/dez.

BOUZON, Z.L. 1993. **Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales - Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. 66p.

BOZHKO, P.V.; FILONOVA, L.H.; SUAREZ, M.R.; HELMERSSON, A.; SMERTENKO, A.P.; ZHIVOTOVSKY, B.; von ARNOLD, S. 2004. **VEIDase is a principal caspase-Mke activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation**. *Cell Death and Differentiation*, 11:175-182.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº6 de 23 de set. de 2008. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, v. 145, n. 185, 24 set. 2008. Seção 1, p. 75-83.

BURLINGAME, L. 1915. **The morphology of *Araucaria brasiliensis*. III. Fertilization, the embryo, and the seed**. *Botanical Gazette*, London, 59:1-39.

- CAIRNEY, J.; PULLMAN G. S. 2007. **The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis**. New Phytologist, 176:511-536.
- CARVALHO, P. E. R. 1994. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: EMBRAPA-SPI, 640 p.**
- CARVALHO, P.E.R. 2003. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 1039 p.
- CORDEIRO, J. 2005. **Levantamnto florístico de caracterização fitossociológica de remanescente de Floresta Ombrófila mista em Guarapuava, PR**. Curitiba: UFPR. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná.
- DODERMAN, V. L., DUCREUX, G., KREIS M. 1997. **Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis**. J. Exp. Bot. 48:1493–1509
- DURZAN, D. J. 1988. **Process control in somatic polyembryogenesis**, In J.E. Hällgren. Proceedings of Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology, 8:147. Swedish University of Agricultural Sciences.
- EIRA, M. T. S.; CUNHA, R.; SALOMÃO, A. N. 1991. **Efeito do tegumento sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Informativo ABRATES, Brasília, 1(4), p.77.
- ESPINDOLA, L. S.; NOIN, M.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. 1994. **Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos**. Seed Science Research, Oxon, v. 4, p. 193-201.
- FARIAS-SOARES, F. L.; BURRIEZA, H. P.; STEINER, N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. 2013. **Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos**. Protoplasma 250:911-918.
- FERGUSON, M. C. 1904. **Contributions to the knowledge of the life history of *Pinus* with special reference to development of the**

gametophytes and fertilization. Proceedings of the Washington Academy of Sciences 6:1-202.

FILONOVA, L.; Von ARNOLD, S.; DANIEL, G.; BOZHKO, P.V. 2002. **Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed.** Cell Death and Differentiation, 9:1057-1062.

FOSTER, A. S. 1949. **Practical plant anatomy.** Princeton, D. van Nostrand Company Inc., 228 p.

GAHAN, P. B., 1984. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction.** Academic Press, London, 304 pp.

GIFFORD, E. M.; FOSTER, A. S. 1989. **Morphology and evolution of vascular plants.** New York: W. H. Freeman, 626 p.

GORDON, E. M., McCANDLESS, E. L. 1973. **Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse.** In: Harvey, M.J., McLachlan, J. (Eds.), *Chondrus Crispus*: T.N. Scot. Inst. Sci., Halifax, pp. 111-133.

GUERRA, M. P.; REIS, M. S.; SCHEINEDE, L.; SILVEIRA, V. 1999. **Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica- *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.** São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. 135 p.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; SANTOS, A. L. W.; ASTARITA, L. V.; NODARI R. O. 2000. **Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.,** In: JAIN S. M.; GUPTA P. K.; NEWTON R.J. (Ed.). *Somatic embryogenesis in woody plants.* Dordrecht: Kluwer, v. 6, p. 457-478.

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M. S.; SCHNEIDER, L. 2002. **Exploração, manejo e conservação da *Araucaria angustifolia*.** In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Org.). *Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais.* São Paulo: Ed. Senac, p. 85-101.

GUERRA, M. P.; STEINER, N.; MANTOVANI, A.; NODARI, R.O.; REIS, M.S; SANTOS, K.L. dos. 2008. **Evolução, ontogênese e**

diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: ROSA LIA BARBIERI; ELISABETH REGINA TEMPEL STUMPF. (Org.). *Origem e Evolução de Plantas Cultivadas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 149-184.

GUERRA, M. P.; STEINER, N.; NODARI, R. O. et al. 2012. ***Araucaria* Evolution, ontogenesis and genetic diversity**. Pages 151-186 in RL Barbieri, ERT Stumpf, eds. *Origin and evolution of cultivated plants*. 1st edn. Brasília.

HAINES, R. J., PRAKASH, N. 1980. **Proembryo development and suspensor elongation in *Araucaria juss.*** Aust. J. Bot. 28:511–522.

HARRIS, N.; OPARKA, K.J. (eds.) 1994. **Plant Cell Biology: a practical approach**. Oxford, IRL Press. 329p.

HOEFLICH, V. A. 2003. *Sistemas de Produção*, 7 ISSN 1678-8281 Versão Eletrônica Jan./2003 **Cultivo do pinheiro-do-paraná**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/PinheirodoParana/CultivodoPinheirodoParana/05_aspectos_economicos_e_ambientais.htm> Acesso em 15/10/2009.

IBGE – 1992. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, Série manuais técnicos em geociências, n.1.

IBGE – 2012. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, Série manuais técnicos em geociências, n.1. 2^a ed.

IUCN **red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>> Acesso em 19/11/2013.

JOHANSEN, D. A. 1950. **Plant embryology: embryology of the spermatophyta**. Massachusetts: Waltham.

KOROL, A., I. PREYGEL, et al. 1994. **Recombination Variability and Evolution**. Chapman & Hall, London.

KUHN, S. A.; MASTROBERTI, A. A.; MARIATH, J. E. A. 2009. **Microsporogenese e microgametogenese do Pinheiro brasileiro -**

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. – Araucariaceae in XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre. Resumos. Porto Alegre: Propesq - UFRGS, v. 1.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P.; REIS, M. S. 2004. **Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Revista Brasileira de Botânica, 27(4):787-796.

MATTOS, J. R. 1972. **O pinheiro brasileiro.** São Paulo: Grêmio Politécnico, 638 p.

MATTOS, J. R. 1994. **O pinheiro brasileiro.** 1º volume. 2ªed. Lages : Artes gráficas princesa, 226 p.

MATTOS, J. R. 2011. **O pinheiro brasileiro.** Florianópolis : Ed. da UFSC. 700 p.

NIEUWLAND, J.; SCOFIELD, S.; MURRAY, J. A. H. 2009. **Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives.** Semin Cell Dev Biol 20:1134-1142

OURIQUES, L. C.; BOUZON, Z. L. 2008. **Organização estrutural e ultra-estrutural das células vegetativas e da estrutura plurilocular de *Hincksia mitchelliae* (Harvey) P C Silva (Ectocarpales, Phaeophyceae).** Rodriguesia 59: 435-447.

OWENS, J. N.; SIMPSON, S. J.; MOLDER, M. 1982. Sexual reproduction of *Pinus contorta*. II. Postdormancy ovule, embryo, and seed development. **Can. J. Bot.** 60:2071–2083.

OWENS, J. N.; MORRIS, S. J.; MISRA, S. 1993. **The ultrastructural, histochemical and biochemical development of the post-fertilization megagametophyte and the zygotic embryo of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.** Can. J. For. Res. 23:816-827.

OWENS, J. N.; CATALANO, G. L.; MORRIS, S. J.; AITKEN-CHRISTIE, J. 1995. **The reproductive biology of *kauri* (*Agathis australis*). I. Pollination and prefertilization development.** Int.J. Plant Sci. 156(3):257-269.

OWENS, J.N. 2004. **The reproductive biology of western white pine.** Prepared for Forest Genetics Council of British Columbia. 44p. ISBN 0-7726-5334-8

OWENS, J.N. 2006. **The reproductive biology of lodgepole pine.** Prepared for Forest Genetics Council of British Columbia. 66p. ISBN 0-7726-5342-9

PALAVAN-UNSAI, N.; BUYUKTUNCER, E.; TUFEKCI, M. A. 2005. **Programmed cell death in plants.** J. Cell. Mol. Biol., 4: 9-23.

PANZA, V., LAÍNEZ, V.; MARODER, H.; PREGO, I.; MALDONADO, S. 2002. **Storage reserves and cellular water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*.** Bot J Linn Soc 140:273-281.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. 1966. **Araucariáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.** 62 p. Flora Ilustrada Catarinense.

RUZIN, S.E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy.** New York: Oxford University Press.

SANTA CATARINA, Lei Estadual nº15.457 de 17 de janeiro de 2011. **Regulamenta a colheita do pinhão.** Diário Oficial do Estado de Santa Catarina n. 19.009 de 18 de jan. 2011. Disponível em: <http://server03.pge.sc.gov.br/LegislacaoEstadual/2011/015457-011-0-2011-001.htm> Acesso em 25/09/2012.

SCHMIDT, E. C.; SCARIOT, L. A.; ROVER, T.; BOUZON, Z. L. 2009. **Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure.** Micron (Oxford. 1993) v. 40, p. 860-869.

SCHMIDT, E. C.; SANTOS, R. dos; HORTA, A.; MARASCHIN, M., BOUZON, Z. L. 2010. **Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance.** Micron, doi:10.1016/j.micron.2010.07.010

SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, B; SANTOS, R; GOUVEIA, C.; COSTA G. B.; FARIA, G.S.M.; SCHERNER, F; HORTA, P A.; PAULA M, R;

LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z L. 2012a. **Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B.** Aquatic Botany, 100:8-17.

SCHMIDT, E. C.; PEREIRA, B.; PONTES, C.L.M.; SANTOS, R.; SCHERNER, F.; HORTA, P. A.; PAULA, M. R.; LATINI, A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. 2012b. **Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales).** Protoplasma, 249: 353-367

SETOGUCHI, H.; OSAWA, T. A.; PINTAUD, J.; JAFFRÉ, T.; VEILLON J. 1998. **Phylogenetic relationships within *Araucariaceae* based on rbcL gene sequences.** Am. J of Botany, 85 (11): 1507-1516.

SEVEGNANI, L.; LAPS, R. R.; SCHROEDER, E. 2013. **O Planalto Central.** In: Biodiversidade catarinense – características, potencialidades, ameaças. Orgs. Sevegnani, L.; Schroeder E. Blumenau: Edifurb. 252 p.

SHIMIZU, J. Y.; OLIVEIRA Y. M. M. 1981. **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil.** Curitiba: EMBRAPA-URPFCS. Curitiba-PR. 9p.

SHIMOYA, C. 1962. **Contribuição ao estudo do ciclo biológico de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Experimentiae, Viçosa, 2(2):519-540.

SHIBATTA, M.; COELHO, C. M. M.; STEINER, N. 2013 **Physiological quality of *Araucaria angustifolia* seeds at diferente stages of development.** Seed Sci Technol, 41(2)214-224.

SILVA, C. V.; REIS, M. S. 2009. **Produção de pinhão na região de Caçador, SC: Aspectos da obtenção e sua importância para comunidades locais.** Ciência Florestal, v.19, n.4, p.363-374.

SINGH, H. 1978. Embryology of gymnosperms. In: Zimmerman W, Carlquist Z, Ozenda P & Wulff HD (eds) **Handbuch der Pflanzenanatomie** (pp 187–241) Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart

- SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. 2006. **Plant stem cells carve their own niche**. Trends Plant Sci 11:241–246
- SMERTENKO, A. P.; BOZHKO, P. V.; FILONOVA, L. H.; von ARNOLD, S.; HUSSEY, P. J. 2003. **Re-organisation of the cytoskeleton during developmental programmed cell death in *Picea abies* embryos**. The Plant Journal, 33:813–824
- SOUTER, M.; LINDSEY, K. 2000. **Polarity and signalling in plant embryogenesis**. Journal of Experimental Botany, 51:971-983.
- SPURR, A.R. 1969. **J. Ultrastructure Res.**, 26, 31.
- STEEVES, T. A.; SUSSEX, I. M. 1989. **Patterns in plant development**. Cambridge University Press, New York.
- STEFENON, V.; CAPESTRANO, C. 2009. **Monoicy in *A. angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae)**: I. Morphological aspects of the reproductive structures. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 81:701-705.
- STEINER, N. 2005a. **Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* Bert O. Kuntze**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- STEINER, N.; VIEIRA, F. do N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. 2005b. **Carbon source affects morphogenesis and histodifferentiation of *A. angustifolia* embryogenic cultures**. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, 48(6):895-903.
- STEINER, N.; SANTA-CATARINA C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; SILVEIRA, V. 2008. ***Araucaria angustifolia* Biotechnology Functional Plant Science and Biotechnology**, Global Science Books.
- SUAREZ M. F.; FILONOVA L. H.; SMERTENKO A.; SAVENKOV, E. I.; CLAPHAM D. H; von ARNOLD, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKO, P.V. 2004. **Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis**. Current Biology 14: R339–R340.

TOMPSETT, P. B. 1984. **Desiccation studies in relation to the storage of Araucaria seed.** Annals of Applied Biology, 105(3)581-586.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.** Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, 1991. 124p.

von ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. 2002. **Developmental pathways of somatic embryogenesis.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69: 233–249.

WEIJERS, D.; JÜRGENS, G. 2005. **Auxin and embryo axis formation: the ends in sight?** Current Opinion in Plant Biology, 8:32-37.

WILLIAMS, C. G. 2009. **Conifer Reproductive Biology.** Springer. 171p.

YAMAGUCHI, R.; ANDREYEV, A.; MURPHY, A. N.; PERKINS, G. A.; ELLISMAN, M. H.; NEWMAYER, D. D. 2007. **Mitochondria frozen with trehalose retain a number of biological functions and preserve outer membrane integrity.** Cell Death and Differentiation 14:616–624